

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Hermann Ammer

Regulation des Wachstums von BT474 humanen
Mammakarzinomzellen durch Morphin

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Inka Regine Weingärtner

aus Schweinfurt

München 2013

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Hermann Ammer

Korreferenten : Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Hans-Joachim Gabius
Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger
Priv.-Doz. Dr. Marlon R. Schneider
Priv.-Doz. Dr. Sabine André

Tag der Promotion: 9. Februar 2013

*Für meine liebe Oma,
meine Eltern,
die besten Brüder
und meinen
wundervollen Freund*

INHALTSVERZEICHNIS

I	EINLEITUNG	1
II	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Opioide und Opioid-Rezeptoren	3
1.1	<i>Opioid-Rezeptoren</i>	3
	Einteilung der Opioid-Rezeptoren	4
	Signaltransduktion über G-Proteine	5
	Klassische Effektorsysteme der Opioid-Rezeptoren.....	6
	Adenylylcyclasen	7
1.2	<i>Liganden der Opioid-Rezeptoren.....</i>	8
	Endogene Liganden.....	8
	Morphin.....	9
	Synthetische Liganden	9
1.3	<i>Interaktionsmöglichkeiten mit anderen Rezeptorsystemen</i>	10
2.	ErbB Rezeptoren	10
2.1	<i>Struktureller Aufbau</i>	11
2.2	<i>Liganden der ErbB Rezeptoren</i>	11
2.3	<i>Aktivierung und Deaktivierung</i>	12
2.4	<i>Besonderheiten der einzelnen ErbB Rezeptoren.....</i>	14
3.	Mitogene Signalwege der Zelle.....	14
3.1	<i>Erk1/2-Signalkaskade</i>	15
3.2	<i>Akt-Signaltransduktion</i>	16
4.	BT474 Zellen.....	16
III	FRAGESTELLUNG	18
IV	MATERIAL UND METHODEN	19
1.	Material	19
1.1	<i>Geräte.....</i>	19
1.2	<i>Zellkultur</i>	21
	Verbrauchsmaterialien	21
	Zellen, Zellkulturmedien und Additive	21

	Gebrauchsfertige Lösungen.....	22
1.3	<i>Molekularbiologie, Proteinanalytik und Zytochemie</i>	23
	Verbrauchsmaterialien	23
	Chemikalien	24
	Puffer.....	26
	Gebrauchsfertige Lösungen.....	28
	Liganden, Stimulatoren und Inhibitoren	28
	DNA, Primer und Antikörper.....	29
	DNA	29
	Primer	29
	Antikörper	30
2.	Methoden.....	32
2.1	<i>Zellkultur</i>	32
	Wachstumsbedingungen.....	32
	mRNA Isolation und cDNA Synthese	33
	Präparation von Zellmembranen	34
	Zellernte und Versuchsvorbereitung	34
	Intrazelluläre cAMP Akkumulation	35
	Bestimmung des Zellwachstums.....	36
	Zellwachstumsbestimmung mittels Kristallviolett-Assay.....	36
	Bestimmung der Proliferationsrate mit BrdU	37
	Stimulation der Erk1/2 und Akt	37
	Darstellung der Apoptose mit Annexin V/Propidiumiodid-Färbung..	38
	Bestimmung des PARP-Abbaus.....	39
2.2	<i>Molekularbiologische, proteinanalytische und zytochemische Methoden</i>	40
	Polymerase-Kettenreaktion und Gelelektrophorese.....	40
	Proteinbestimmung nach Lowry	42
	Radioligandenbindung	43
	Western Blot.....	44
	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	48
	Co-Immunpräzipitation	48
2.3	<i>Datenauswertung</i>	49

V	ERGEBNISSE	50
1.	Charakterisierung der BT474 Zellen	50
<i>1.1</i>	<i>Endogene Opioid-Rezeptoren in BT474 Zellen</i>	<i>50</i>
<i>1.2</i>	<i>Bestimmung der Rezeptormenge durch Radioligandenbindung</i>	<i>51</i>
<i>1.3</i>	<i>Ausstattung der BT474 Zellen mit G-Proteinen</i>	<i>51</i>
<i>1.4</i>	<i>Adenylylcyclasen als Effektorsysteme der Opioid-Rezeptoren</i>	<i>52</i>
<i>1.5</i>	<i>Regulation der intrazellulären cAMP-Akkumulation</i>	<i>52</i>
2.	Interaktion von Opioiden mit dem Zellwachstum	53
3.	Beeinflussung der Proliferation durch Opioiden.....	55
<i>3.1</i>	<i>Aktivierung der Erk1/2 durch Opioiden</i>	<i>55</i>
<i>3.2</i>	<i>Bestimmung der Proliferationsrate mittels BrdU-Assay</i>	<i>57</i>
4.	Interaktion von Morphin mit dem Akt-Signalweg.....	58
5.	Induktion der Apoptose durch Morphin	59
<i>5.1</i>	<i>PARP Degradation in BT474 Zellen</i>	<i>59</i>
<i>5.2</i>	<i>Annexin V/Propidiumiodid-Färbung</i>	<i>60</i>
6.	Durch chronische Morphin-Behandlung induzierte Veränderungen im ErbB Signalweg.....	62
<i>6.1</i>	<i>Untersuchung des Mechanismus der Erk1/2-Aktivierung</i>	<i>62</i>
<i>6.2</i>	<i>Untersuchung des Mechanismus der Akt-Aktivierung.....</i>	<i>64</i>
7.	Rolle des ErbB1 Rezeptors in der Erk1/2- und Akt-Aktivierung.....	65
8.	Veränderungen in der relativen ErbB Rezeptor-Menge und der Bildung von Rezeptor-Heterodimeren nach chronischer Morphin- Behandlung	67
<i>8.1</i>	<i>Bestimmung der relativen ErbB Rezeptor-Menge nach chronischer Morphin-Behandlung</i>	<i>67</i>
<i>8.2</i>	<i>Bestimmung der ErbB1 Heterodimere nach Opioid-Behandlung</i>	<i>68</i>
VI	DISKUSSION	70
1.	BT474 als Zellmodell für μ-Opioid-Rezeptor vermittelte Effekte.....	70
2.	Einfluss von Morphin auf das Wachstum von BT474 Zellen	71

3.	Regulation der BT474 Zellproliferation und Apoptose durch Morphin.....	72
4.	Morphologische Veränderungen der BT474 Zellen durch Behandlung mit Morphin und Heregulin- β 1.....	74
5.	Interaktion von Morphin mit dem ErbB Rezeptor-Netzwerk	75
6.	Schlussfolgerung.....	80
VII	ZUSAMMENFASSUNG	82
VIII	SUMMARY	83
IX	LITERATURVERZEICHNIS	84
X	ANHANG	94
1.	Abbildungsverzeichnis	94
XI	DANKSAGUNG	96

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung	DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
AC	Adenylylcyclase	DMEH	DMEM mit Hepes
AG825	(E)-3-[3-[2-Benzothiaolythio]methyl]-4-hydroxy-5-methoxyphenyl]-2-cyano-2-propenamdid	DMSO	Dimethylsulfoxid
AG1478	N-(3-Chlorophenyl)-6,7-dimethoxy-4-quinazolinamin	DNA	Desoxyribonukleinsäure
AK	Antikörper	DOR	δ -Opioid-Rezeptor
Aq.	Doppelt destilliertes Wasser	DTT	Threo-1,4-dimercapto-2,3-butanediol
Bidest.		EAH	Essigsäureanhydrid
AR	Amphiregulin	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ATP	Adenosintriphosphat	EGF	Epidermal growth factor
Bp	Basenpaar	EGTA	Ethylenglycol-bis(β -aminoethylether)-N,N,N',N',-tetraessigsäure
BSA	Bovines Serumalbumin	ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
BTC	Betacellulin	ER	Epiregulin
cAMP	Zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat	Erk	Extracellular signal-regulated kinase
cDNA	Komplementäre DNA	EtOH	Ethanol
Ci	Curie	FKS	Fetales Kälberserum
cn	Kontrolle	For.	Forskolin
CO ₂	Kohlenstoffdioxid	GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
cpm	Counts per minute	G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
CTC	Kupfersulfat-Tartrat-Natrium-Carbonat Lösung		

GDP	Guanosindiphosphat	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
GTP	Guanosintriphosphat	PEG	Polyethylenglycol
h	Stunde	Pen	Penicillin
HB	Homogenisierungspuffer	PMSF	Phenylmethylsulfonyl-Fluorid
HB-EGF	Heparin-binding EGF-like growth factor	Pi3K	Phosphoinositid-3-Kinase
HCl	Salzsäure	RNA	Ribonukleinsäure
Hepes	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]	RT	Reverse Transkriptase
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin	Rt	Raumtemperatur
IC ₅₀	Halbmaximale Hemmkonzentration	sec	Sekunde
JNK	c-Jun N-terminale Kinase	SDS	Natrium-Dodecylsulfat
kb	Kilobasenpaare	Strep	Streptomycin
K _D	Dissoziationskonstante	TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
KOR	κ-Opioid-Rezeptor	TEA	Triethylamin
mAb	Monoklonaler Antikörper	TBS/T	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase	TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
MG	Molekulargewicht	TGF-α	Transforming growth factor-α
min	Minute	Tris	Trihydroxymethylamino-methan
MOR	μ-Opioid-Rezeptor	UV	Ultraviolett
mRNA	Messenger RNA	Wort.	Wortmannin
PAA	Polyacrylamid		
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung		

I EINLEITUNG

Brustkrebs ist eine der häufigsten tumorbedingten Todesursachen der Frau weltweit [1]. Während Proliferation, Zellwachstum und Apoptose in gesunden Zellen einer strengen Kontrolle unterliegen, zeichnen sich Tumorzellen durch Störungen im komplexen Netzwerk der Wachstumsregulation aus [2]. Da verschiedene Tumorzellen überaktive Rezeptorsysteme für Wachstumsfaktoren aufweisen [3], war ein wichtiges Forschungsziel der letzten Jahrzehnte die Entwicklung zielgerichteter Therapiestrategien gegen diese Oberflächenproteine [4]. So wurden unter anderem für die Behandlung bestimmter Mammatumoren monoklonale Antikörper gegen spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche sowie Tyrosinkinase-Inhibitoren für die Blockade nachgeschalteter Signalwege entwickelt und erfolgreich in die Therapie eingeführt [1]. So hilfreich diese neuen Therapieansätze zunächst erscheinen, ergibt sich über einen längeren Behandlungszeitraum, insbesondere bei Anwendung in Form einer Monotherapie, das Problem der Entwicklung vielfältiger Resistenzmechanismen gegenüber solchen Therapieansätzen [1]. Ursache hierfür ist die Tatsache, dass Tumorzellen ein komplexes System alternativer mitogener Signalwege besitzen. So können Tumorzellen bei Blockade spezifischer Wachstumsfaktor-Rezeptoren oder den ihnen nachgeschalteten Mechanismen mit einer kompensatorischen Aktivierung redundanter Signaltransduktionswege reagieren [5]. Ergänzt und erweitert wird dies durch verschiedene Interaktionsmöglichkeiten unterschiedlicher Rezeptor-Typen mit einer Vielzahl nachgeschalteter Mechanismen [6]. Hieraus ergibt sich die Forderung nach einer kombinierten Anwendung verschiedener Antineoplastika, die durch Eingriffe in verschiedene Signaltransduktionswege der Tumorzelle das Tumorwachstum zuverlässig hemmen sollen. Der Schlüssel für eine effektive Therapie liegt in der Kenntnis in welcher Weise die verschiedenen Bestandteile einer Kombinationstherapie Einfluss auf das Wachstum der Tumorzellen durch Interaktion mit intrazellulären Signalmechanismen nehmen.

Haupteinsatzgebiet der Opioide als starke Analgetika ist neben der Narkoseprämedikation die Behandlung starker Schmerzen, wie Tumorschmerzen [7-9]. Darüber hinaus ist bekannt, dass Opioide neben ihrer „klassischen“ analgetischen Wirkung auf verschiedenste Weise auch in den Zellzyklus eingreifen können, direkt oder durch Transaktivierung von Wachstumsfaktor-

Rezeptoren [10, 11].

Ziel dieser Arbeit ist es, die spezifisch von Opioid-Rezeptoren vermittelten Effekte auf das Zellwachstum und die Interaktion mit Wachstumsfaktor-vermittelten Signalwegen in einer Brustkrebszelllinie näher zu untersuchen. Hierdurch sollen mögliche Vorteile oder Risiken einer therapiebegleitenden Schmerzmedikation durch Opioide bei Brustkrebspatientinnen besser beurteilt werden können.

II LITERATURÜBERSICHT

1. Opioide und Opioid-Rezeptoren

Opioide sind starke Analgetika, die ihre Wirkung über spezifische Rezeptoren vermitteln [9, 12]. Die erste isolierte Substanz dieser Stoffgruppe war das Morphin. Seit Entdeckung der schmerzstillenden Wirkung des Alkaloids aus dem Saft des Schlafmohns begann die Suche nach den Wirkungsmechanismen dieser Stoffklasse [13].

1.1 Opioid-Rezeptoren

Mit Hilfe radioaktiv markierter Liganden gelang es, Opioid-Rezeptoren im Gehirn nachzuweisen [14, 15]. Bereits frühzeitig gab es Hinweise auf verschiedene Rezeptor-Typen, da Nalorphin die Wirkung anderer Opioide in unterschiedlichen Konzentrationen aufzuheben vermochte [16, 17]. Anhand von Experimenten an Hunden mit chronischen Schmerzen konnten 1976 drei verschiedene Typen von Opioid-Rezeptoren identifiziert werden: der μ -, der κ - und der σ -Opioid-Rezeptor [18, 19]. Es kamen kurz darauf der δ -Opioid-Rezeptor, als Bindungspartner der Enkephaline [20] und der ε -Opioid-Rezeptor, mit hoher Affinität für β -Endorphin, hinzu [21]. Parallel zur Suche nach den Rezeptoren wurden die Bestrebungen, ihre natürlichen Liganden zu identifizieren, vorangetrieben. Auf diesem Weg konnten die Familien der Enkephaline, Dynorphine und Endomorphine sowie das β -Endorphin identifiziert werden [13-15].

Allen Opioid-Rezeptoren gemeinsam ist, dass es sich um membrangebundene Rezeptoren handelt, deren spezifische Liganden durch Opioid-Antagonisten verdrängt werden [9]. Der Opioid-Antagonist Naloxon hebt die Wirkung sowohl endogener als auch exogen zugeführter Opioide auf. Naloxon wirkt an allen Opioid-Rezeptoren antagonistisch, mit einer geringen Präferenz für μ -Opioid-Rezeptoren [9]. In höheren Konzentrationen bindet Naloxon auch an den δ - und den κ -Opioid-Rezeptor. Der ursprünglich entdeckte σ -Opioid-Rezeptor wird heute nicht mehr zu den Opioid-Rezeptoren gerechnet, da seine Wirkung durch Naloxon nicht antagonisierbar ist [9]. Die Reversibilität der Opioid-Effekte durch einen Antagonisten gilt als pharmakologisches Kriterium für eine Opioid-Rezeptor vermittelte Wirkung [22].

Einteilung der Opioid-Rezeptoren

Man unterscheidet heute beim Menschen drei verschiedene Typen der Opioid-Rezeptoren, den μ -, den δ - und den κ -Opioid-Rezeptor. Ursprünglich wurden diese nach ihrer Selektivität gegenüber bestimmten Opioiden typisiert [23]. So zeichnen sich μ -Opioid-Rezeptoren durch eine hohe Affinität zu Morphin, δ -Opioid-Rezeptoren zu [Leu]- und [Met]-Enkephalin und κ -Opioid-Rezeptoren durch ihre hohe Affinität zu Ketocyclazocin aus [24]. Diese Einteilung wurde bald darauf durch die molekulare Klonierung der entsprechenden Gene bestätigt [25-28]. Die verschiedenen Typen lassen sich weiterhin pharmakologisch in Subtypen unterteilen. Bislang konnten für den humanen μ -Opioid-Rezeptor drei ($\mu 1$, $\mu 2$, $\mu 3$), für den δ -Opioid-Rezeptor zwei ($\delta 1$, $\delta 2$) und für den κ -Opioid-Rezeptor vier Subtypen ($\kappa 1a$, $\kappa 1b$, $\kappa 2$, $\kappa 3$) identifiziert werden [24]. Trotz der ausgeprägten strukturellen Ähnlichkeit unterscheiden sich die drei Opioid-Rezeptor-Typen insbesondere in ihrer Selektivität gegenüber endogenen und exogenen Liganden [29] sowie ihrer Expression in verschiedenen Geweben [8]. Neben ihrem Vorkommen im zentralen und peripheren Nervensystem, wurden Opioid-Rezeptoren unter anderem auch in Immunzellen, Herzmuskelzellen und in verschiedenen Tumorzellen nachgewiesen [10].

Charakteristisch für Opioid-Rezeptoren ist die Entwicklung von Toleranz nach langfristiger Exposition gegenüber Agonisten [13]. Wie andere G-Protein (Guaninnukleotid-bindende Protein)-gekoppelte Rezeptoren auch, werden Opioid-Rezeptoren nach ihrer Aktivierung von der Plasmamembran in zytosolische Kompartimente umverteilt [9]. Die schnelle Desensibilisierung von Opioid-Rezeptoren nach ihrer Aktivierung wird durch ihre Phosphorylierung und nachfolgende Bindung an β -Arrestin eingeleitet [30]. Die Rezeptoren werden so von ihren assoziierten G-Proteinen abgekoppelt und in Endosomen internalisiert. In Abhängigkeit von der Dauer der Rezeptoraktivierung können die Rezeptoren nachfolgend entweder dephosphoryliert und recycelt oder aber über Endolysosomen degradiert werden [24, 31]. Während δ -Opioid-Rezeptoren relativ schnell degradiert werden, weisen sich μ -Opioid-Rezeptoren durch ein gesteigertes Recycling aus. Sie unterliegen somit einem geringeren Sensitivitätsverlust gegenüber langfristig einwirkenden Liganden. Humane κ -Opioid-Rezeptoren hingegen unterliegen keiner Liganden-abhängigen Regulation [9, 32]. Die Agonist-induzierte Desensibilisierung wird als eine der Ursachen für

die schnelle Toleranzentwicklung angesehen. Das Ausmaß der Desensibilisierung hängt dabei von der Dauer der Exposition und der intrinsischen Aktivität des Agonisten ab [31].

Signaltransduktion über G-Proteine

Opioid-Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren [13]. Diese bestehen aus dem extrazellulären N-Terminus, sieben transmembranären Domänen, die gleichzeitig drei extra- und intrazelluläre Schleifen ausbilden und einem intrazellulären C-Terminus [29]. Die Opioid-Rezeptoren weisen eine Homologie von 60% auf, wobei sich die Struktur der transmembranären Domänen und der intrazellulären Schleifen stark ähneln. Sequenzunterschiede bestehen vor allem in den extrazellulären Schleifen sowie im C- und N-Terminus [29, 32]. Die extrazellulären Domänen sind an der Ligandenbindung beteiligt, während die intrazellulären Schleifen und der C-Terminus für die Kopplung an G-Proteine verantwortlich sind [33].

Die G-Proteine selbst stellen heterotrimere Proteine dar, die aus einer α -Untereinheit und einem funktionellen $\beta\gamma$ -Dimer bestehen [34-36]. Die α -Untereinheit besitzt eine Bindungsstelle für Guaninnukleotide und eine intrinsische GTPase-Funktion für die Hydrolyse von GTP zu GDP. Solange GDP gebunden ist, kann das $\beta\gamma$ -Dimer an die α -Untereinheit binden. Die Bindung der $\beta\gamma$ -Untereinheit wiederum verstärkt die Fähigkeit der Kopplung des G-Proteins an den Rezeptor. In der GDP-gebundenen Form ist das G-Protein inaktiv und fähig, an einen nicht-aktivierten Rezeptoren zu binden [36]. Nach Rezeptoraktivierung dissoziiert GDP ab, woraufhin GTP mit hoher Affinität gebunden wird, dieses liegt in der Zelle in hohem Überschuss vor. Die GTP-gebundene α -Untereinheit dissoziiert daraufhin ab und kann wie die freigesetzten $\beta\gamma$ -Dimere entsprechende Effektorsysteme aktivieren [35, 36]. Durch die Hydrolyse von GTP zu GDP wird die Aktivierung der α -Untereinheit beendet, die $\beta\gamma$ -Untereinheit kann wieder reassoziieren [36]. Die schematische Struktur eines inaktiven G-Protein-gekoppelten Rezeptors und die Ereignisse nach Aktivierung durch Ligandenbindung werden in Abbildung 1 verdeutlicht.

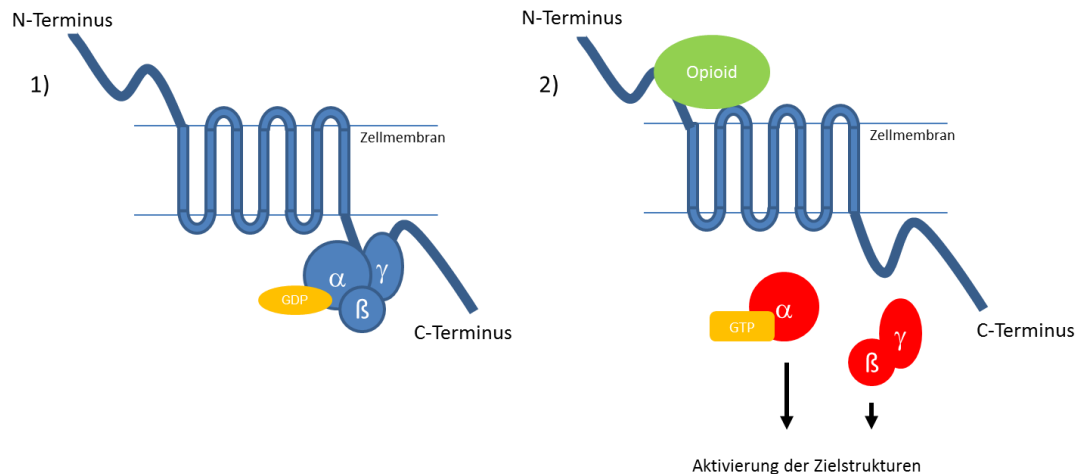


Abb. 1 Schematische Struktur eines G-Protein-gekoppelten Opioid-Rezeptors.

1) Inaktiver Rezeptor mit assoziiertem G-Protein. 2) Durch Ligandenbindung aktivierter Rezeptor, das G-Protein dissoziiert ab und kann in der Folge die intrazellulären Zielstrukturen aktivieren.

Welche Effektorwege durch das G-Protein aktiviert werden, hängt ab von der Zusammensetzung aus Subtypen der α -, β - und γ -Untereinheiten [34, 37]. Charakterisiert werden die verschiedenen Untereinheiten unter anderem durch ihre Sensitivität gegenüber zweier bakterieller Toxine, dem Pertussis-Toxin (PTX) aus *Bordetella pertussis* und dem Cholera-Toxin (CTX) aus *Vibrio cholerae* [38, 39]. Nach Art der α -Untereinheit lassen sich die G-Proteine in vier Gruppen einteilen: G_s -Proteine sind CTX-sensitiv und umfassen α_s - oder α_{olf} -Untereinheiten; G_i -Proteine bestehen aus den PTX-sensitiven α_{i1-3} -, α_o - oder PTX-insensitiven α_z -Untereinheiten; G_q -Proteine enthalten $\alpha_{q/11}$ - oder α_{16} -Untereinheiten und G_{12} -Proteine sind durch α_{12} - und α_{13} -Untereinheiten charakterisiert [37-39]. Die Signaltransduktion hängt darüber hinaus auch von der Ausstattung der Zelle mit verschiedenen Effektorsystemen ab [36]. Opioid-Rezeptoren leiten ihre Information hauptsächlich durch Kopplung an G_i - und G_q -Proteine weiter [38]. Die analgetische Wirkung durch μ -Opioid-Rezeptoraktivierung wird über PTX-sensitive G_i -Proteine vermittelt [7].

Klassische Effektorsysteme der Opioid-Rezeptoren

Zu den „klassischen“ Effektorsystemen der Opioid-Rezeptoren werden Adenylylcyclasen, Kalium(K^+)-Kanäle und spannungsabhängige Calcium(Ca^{2+})-Kanäle gezählt. Eine Aktivierung der Opioid-Rezeptoren resultiert in einer Inhibition spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle und einer Aktivierung

hyperpolarisierender K^+ -Kanäle [13]. Die Regulation der Adenylylcyclasen führt zu Änderungen im intrazellulären Gehalt des „second-messengers“ 3',5'-zyklisches Adenosin Monophosphat (cAMP) [35].

Adenylylcyclasen

cAMP ist eines der wichtigsten Signalmoleküle, das in den Zellen von Säugetieren und dem Menschen durch Adenylylcyclasen synthetisiert wird [40]. Die Familie der Adenylylcyclasen besteht aus 9 membrangebundenen Isoformen (AC1-9) und einer weiteren löslichen Isoform, die sich in vielen Charakteristika von den membrangebundenen Formen unterscheidet [41, 42]. Die 9 Isoformen besitzen ein Molekulargewicht von 120-150 kDa, das durch Glykosylierung erhöht werden kann. Die Adenylylcyclasen bestehen aus einem kurzen N-Terminus, zwei großen hydrophilen zytoplasmatischen Schleifen (C1 und C2) und zwei hydrophoben Abschnitten (M1 und M2), die von jeweils 6 Plasmamembran-durchspannenden Domänen gebildet werden [40, 41]. Die katalytische Region wird aus Teilen der beiden zytoplasmatischen Schleifen gebildet (C1a und C2a). Das Substrat der Adenylylcyclasen ist an zweiwertige metallische Kationen wie Magnesium (Mg^{2+}) oder Mangan (Mn^{2+}) gebundenes Adenosintriphosphat (ATP), unter physiologischen Bedingungen ist es Mg^{2+} -ATP [41].

Die Regulation der Adenylylcyclasen erfolgt primär über α_s -, α_i - und $\beta\gamma$ -Untereinheiten der G-Proteine, eine weitere Modulation der Aktivität ist aber auch durch Ca^{2+} /Calmodulin, Adenosin und durch die Proteinkinasen A (PKA) und C (PKC) möglich. Darüber hinaus werden alle Isoformen durch das Diterpen Forskolin aus *Coleus forskolii* stimuliert [40, 41, 43]. Aufgrund ihrer Sensitivität gegenüber den verschiedenen Regulatoren können die 9 Isoformen in verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Die erste Gruppe kann durch Ca^{2+} /Calmodulin aktiviert werden und umfasst die AC1, 3 und 8. Die zweite Gruppe wird durch die PKC phosphoryliert und stimuliert, ebenso wie durch die $\beta\gamma$ -Untereinheit der G-Proteine. Ihr gehören die Isoformen 2, 4 und 7 an. Die dritte Gruppe umfasst die AC5 und 6, die durch niedrige Ca^{2+} -Konzentrationen inhibiert werden. Die vierte Gruppe schließlich wird durch die AC9 repräsentiert, die weder durch Ca^{2+} noch durch $\beta\gamma$ -Untereinheiten der G-Proteine reguliert wird [41]. Die α_s -Untereinheit der G-Proteine führt immer zu einer Stimulation, eine Inhibition durch die α_i -Untereinheiten und eine Regulation durch die $\beta\gamma$ -Untereinheit ist dagegen abhängig von der jeweiligen AC-Isoform [40]. Die $\beta\gamma$ -

Untereinheit kann durch Komplexierung der α_s -Untereinheit inhibitorisch wirken, aber auch selbst in Anwesenheit von α_s die AC2, 4 und 7 aktivieren. $\beta\gamma$ -Untereinheiten inhibieren die AC1 und haben keinen Einfluss auf die Aktivität der AC3, 5, 6, 8 und 9. Die PKA-vermittelte Phosphorylierung der AC5 und 6 kann als negativer Rückkopplungsmechanismus verstanden werden, da diese Proteinkinase cAMP-abhängig ist [41].

Der Effekt von Opioiden auf die intrazelluläre cAMP Produktion hängt maßgeblich von der Ausstattung einer Zelle mit verschiedenen G-Proteinen und Adenylylcyclasen ab [38, 41]. Die Fähigkeit der Opioid-Rezeptoren die PKC und die intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen zu regulieren ist zudem eine Möglichkeit, indirekt Einfluss auf Ca^{2+} /Calmodulin- oder PKC-abhängige Adenylylcyclase-Subtypen zu nehmen [29]. Die Regulation der intrazellulären cAMP-Produktion wird als Marker für die Funktion von Opioid-Rezeptoren herangezogen, da die Desensibilisierung von Opioid-Rezeptoren mit dem Verlust der Regulation der Adenylylcyclasen einhergeht [23].

1.2 Liganden der Opioid-Rezeptoren

Endogene Liganden der Opioid-Rezeptoren sind Substanzen, die im Körper synthetisiert werden und spezifisch an Opioid-Rezeptoren binden [8]. Die natürlichen Liganden weisen eine bestimmte Selektivität gegenüber den verschiedenen Rezeptor-Typen auf, es handelt sich dabei jedoch nicht um eine absolute Präferenz gegenüber einem bestimmten Rezeptor-Typ [9]. Darüber hinaus wurden für die verschiedenen Rezeptor-Typen jeweils hochspezifische Liganden synthetisiert, die sich teilweise durch eine weitaus größere Spezifität als die endogenen Liganden auszeichnen. Die Affinität zu spezifischen Liganden dient unter anderem auch der pharmakologischen Charakterisierung und der Einteilung in die Rezeptor-Typen und ihre Subtypen [13].

Endogene Liganden

Endogene Liganden für Opioid-Rezeptoren werden vor allem im zentralen und peripheren Nervensystem gebildet. Sie stellen wichtige Modulatoren des Immunsystems dar und beeinflussen endokrine, gastrointestinale und kardiovaskuläre Funktionen [8]. Zu den natürlichen Liganden gehören die Enkephaline ([Met]- und [Leu]-Enkephalin), β -Endorphin und die Dynorphine (A und B). Pro-Opiomelanocortin dient als Vorläufer sowohl für β -Endorphin, als auch für ACTH

(Adrenocorticotropes Hormon) und MSH (Melanozyten-stimulierendes Hormon). β -Endorphin bindet mit vergleichbarer Affinität an den μ - und den δ -Opioid-Rezeptor, dagegen nur mit geringer Affinität an den κ -Opioid-Rezeptor [9]. [Met]- und [Leu]-Enkephalin entstehen aus Proenkephalin und binden insbesondere an den δ -Opioid-Rezeptor. Dynorphin bindet mit hoher Affinität an den κ -Opioid-Rezeptor, mit geringerer Affinität jedoch auch an die anderen beiden Opioid-Rezeptoren und wird aus dem Vorläuferprotein Prodynorphin prozessiert [9, 32]. In den 1990er Jahren wurden schließlich die Endomorphine (Endomorphin-1 und Endomorphin-2) beschrieben, die mit hoher Affinität an den μ -Opioid-Rezeptor binden. Für sie konnte bisher jedoch noch kein Vorläuferprotein identifiziert werden [32, 44].

Morphin

Nach wie vor sind Morphin und andere Opioide Mittel der Wahl zur Behandlung starker und chronischer Schmerzzustände [7, 8, 10]. Die Mehrzahl klinisch relevanter Opioide stellen Agonisten des μ -Opioid-Rezeptors dar. Seit Mitte des 19. Jahrhunderts findet Morphin Anwendung als Analgetikum, Sedativum und Antitussivum [9]. Die analgetische Wirkung des Schlafmohns, aus dem das Morphin gewonnen wird, ist dagegen schon vor vielen hundert Jahren bekannt gewesen. Morphin ist eines der in *Papaver somniferum* enthaltenen Alkaloide [32]. Morphin ist ein Agonist am μ - und δ -Opioid-Rezeptor mit Präferenz für den μ -Opioid-Rezeptor. Daneben wirkt Morphin auch am κ -Opioid-Rezeptor als Partialagonist [45].

Im Gegensatz zu anderen Liganden führt die Aktivierung von μ -Opioid-Rezeptoren durch Morphin nicht zu einer vermehrten Rezeptor-Internalisierung [46]. Der hochspezifische μ -Opioid-Rezeptor Agonist DAMGO bedingt, wie auch viele endogene Opioide, eine vermehrte Endozytose der Rezeptoren [7, 23, 32].

Synthetische Liganden

Für alle drei Opioid-Rezeptoren wurde eine Vielzahl an hochaffinen, spezifischen Liganden synthetisiert, die auch zur Identifizierung und Charakterisierung der verschiedenen Rezeptor-Subtypen genutzt werden. Der μ -Opioid-Rezeptor wird durch eine hohe Bindungsaffinität zu seinem synthetischen Enkephalinderivat DAMGO, der δ -Opioid-Rezeptor durch eine hohe Bindungsaffinität zu dem peptidergen Agonisten DPDPE und der κ -Opioid-Rezeptor durch eine hohe

Affinität zu den synthetischen Verbindungen U50,488 und U69,593 charakterisiert. Während U50,488 an $\kappa 1$ - und $\kappa 2$ -Subtypen bindet, weist U69,593 eine hohe Selektivität gegenüber dem $\kappa 1$ -Subtyp auf [13].

1.3 Interaktionsmöglichkeiten mit anderen Rezeptorsystemen

Abgesehen von den „klassischen“ Signalwegen sind Opioid-Rezeptoren in der Lage, über verschiedene intra- und extrazelluläre Mechanismen mit mitogenen Signalwegen zu interagieren [11]. Insbesondere durch Transaktivierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) können Opioide mit verschiedenen Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAPK) interferieren, zu denen die extrazellulär Signal-regulierten Kinasen 1/2 (Erk1/2), die c-Jun N-terminale Kinase und die p38 Mitogen-aktivierte Kinase gehören. Zudem ist auch eine direkte Regulation durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, beispielsweise über β -Arrestin 2 möglich [29, 47]. Darüber hinaus können Opioide auch über den Signal Transducer and Activator of Transcription 5 (STAT5) und die Protein Kinase B (PKB/Akt) mitogene Signale vermitteln [11, 48]. In Abhängigkeit des untersuchten Zellsystems können Opioide sowohl den Erk1/2- als auch den Akt-Signalweg aktivieren oder hemmen [7].

Aufgrund dieser Mechanismen ergeben sich für Opioide vielfältige Möglichkeiten in mitogene Signalwege und in das Wachstumsverhalten von Tumorzellen einzugreifen.

2. ErbB Rezeptoren

Die ErbB Rezeptoren stellen die bedeutendste Familie der Wachstumsfaktor-Rezeptoren dar, die zu den Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) gezählt werden. Die vier Mitglieder werden als ErbB1, ErbB2, ErbB3 und ErbB4 oder alternativ auch als HER1, HER2, HER3 und HER4 bezeichnet [3, 49]. Die ErbB Rezeptoren werden in Geweben mesenchymalen und epidermalen Ursprungs exprimiert und sind für die Regulation von Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose verantwortlich [50, 51]. Viele Tumorzellen weisen Abweichungen von der natürlichen Ausstattung mit ErbB Rezeptoren auf und nutzen die potenten Wachstumssignale der ErbB Rezeptoren für eine schnelle klonale Expansion [50]. Die Überexpression und gesteigerte Aktivierung einzelner ErbB Rezeptoren resultiert in einer ungehinderten Proliferation, Migration, Metastasierung und

verminderter Apoptose [3]. Insbesondere der ErbB1 und der ErbB2 werden in vielen verschiedenen Tumorzellarten überexprimiert [51].

Die ErbB Rezeptoren zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, in einer Zelle eine Vielzahl verschiedener mitogener Signalwege aktivieren zu können [49]. In welcher Weise dabei die Proliferation einerseits und die Apoptose andererseits beeinflusst werden, hängt vom Zelltyp, vom Zellzyklus sowie von der Ausstattung der Zelle mit verschiedenen Rezeptoren und Signalwegen ab [49]. Darüber hinaus nehmen die beteiligten Rezeptor-Typen und deren Liganden Einfluss auf die Art der Signalweiterleitung [50-52]. Insbesondere der ErbB2 wird in verschiedenen Mammakarzinomen als Resultat einer Genamplifikation überexprimiert und stellt dadurch ein prädestiniertes Angriffsziel für die Entwicklung spezifischer, zielgerichteter Therapiestrategien dar [4, 53].

2.1 Struktureller Aufbau

Strukturell bestehen ErbB Rezeptoren aus drei verschiedenen Domänen. Die extrazelluläre Domäne ist zuständig für die Ligandenbindung, über eine einzelne Trans-Membran-Domäne werden die Signale an die intrazelluläre Domäne weitergeleitet. Diese beinhaltet die Tyrosin-Kinase-Funktion und vermittelt die Signalweiterleitung an entsprechende intrazelluläre Adapterproteine [54]. Neben der katalytischen Einheit trägt die intrazelluläre Domäne auch verschiedene regulatorische Phosphorylierungsstellen [51, 54].

Obwohl die vier ErbB Rezeptor-Typen über einen gemeinsamen Bauplan verfügen, weisen sie funktionelle Unterschiede in Bezug auf die Ligandenbindung und katalytische Aktivität auf [52].

2.2 Liganden der ErbB Rezeptoren

Die endogenen Liganden der ErbB Rezeptoren umfassen die Neureguline 1-4 (NRG1-4), die alternativ auch als Hereguline (HRG) bezeichnet werden. Unter ihnen ist HRG1 mit den Splicevarianten α , β 1, β 2 und β 3 am besten charakterisiert [49]. HRG1 und HRG2 binden sowohl an ErbB3 als auch an ErbB4, HRG3 und HRG4 dagegen nur an ErbB4 [51]. Der Epidermal growth factor (EGF), der Transforming growth factor- α (TGF- α), der Heparin-bindende EGF-like growth factor (HB-EGF), Epiregulin (ER), Amphiregulin (AR) und Betacellulin (BTC) stellen Liganden des ErbB1 dar [49]. ER, BTC und HB-EGF können zusätzlich auch an ErbB4 binden [6]. Für ErbB2 ist derzeit noch kein endogener Ligand

bekannt [51]. Die Liganden der ErbB Rezeptoren werden aus Zellmembran-gebundenen Vorstufen, durch Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) enzymatisch freigesetzt [4, 50]. Abbildung 2 stellt die ErbB Rezeptoren und ihre endogenen Liganden schematisch dar.

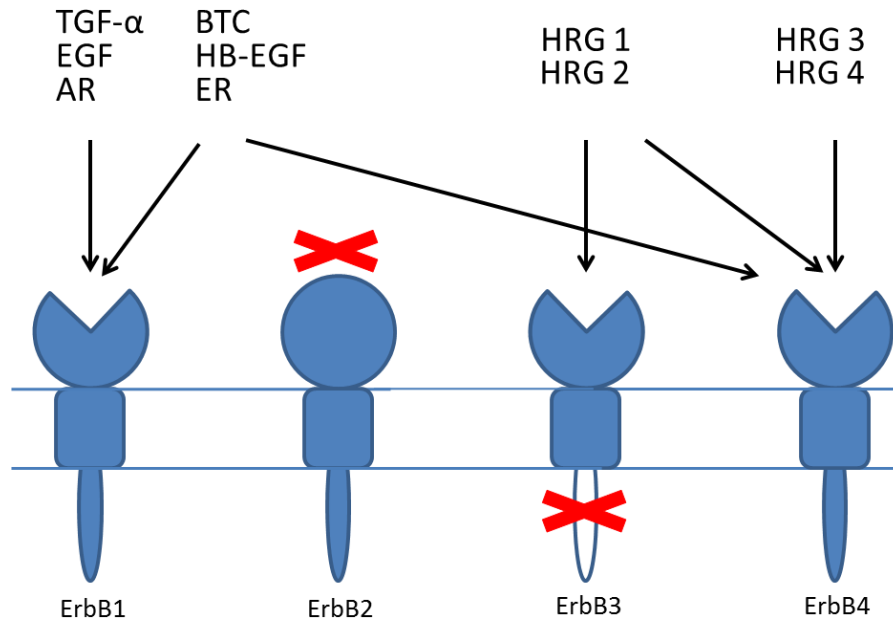


Abb. 2 ErbB Rezeptoren und ihre endogenen Liganden.

Von links nach rechts: ErbB1 mit seinen Liganden TGF- α , EGF, AR, BTC, HB-EGF, ER; ErbB2, bisher ohne endogenen Liganden; ErbB3 mit seinen Liganden HRG1 und HRG2 und defekter Tyrosin-Kinase-Funktion; ErbB4 mit seinen Liganden HRG1-4.

2.3 Aktivierung und Deaktivierung

Nach Aktivierung vermitteln die ErbB Rezeptoren ihre Signale durch Bildung von Homo- oder Heterodimeren [51]. Die Bildung einzelner Rezeptor-Dimere ist von verschiedenen Faktoren abhängig: Einerseits von der qualitativen und quantitativen Ausstattung der Zelle mit einzelnen ErbB Rezeptor-Typen und deren Präferenz für bestimmte Bindungspartner sowie andererseits vom aktivierenden Liganden [50]. Die Aktivierung eines ErbB Rezeptors durch Ligandenbindung ist schematisch in Abbildung 3 dargestellt.

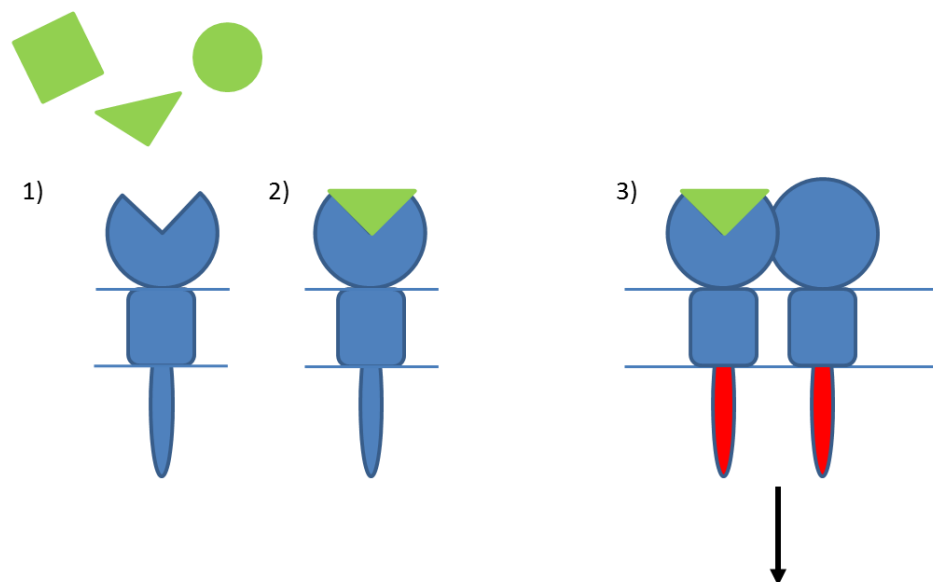


Abb. 3 Aktivierung der ErbB Rezeptoren.

1) Inaktiver Rezeptor. 2) Aktiviertes Rezeptormonomer nach Ligandenbindung. 3) Dimerisierung mit einem zweiten ErbB Rezeptor-Monomer führt zur Aktivierung der Kinase-Funktion und ermöglicht die Aktivierung intrazellulärer Effektoren.

Die Aktivierung eines Rezeptors durch Bindung eines Liganden führt zu Konformationsänderungen in der extrazellulären Domäne und ermöglicht so die Dimerisierung mit einem Partner [54]. Die Dimerisierung führt zur Aktivierung der Rezeptoren durch Auto- oder gegenseitige Phosphorylierung mit anschließender Aktivierung der Tyrosin-Kinase-Funktion [49]. Die Phosphorylierung C-terminaler Tyrosinreste ermöglicht zudem die Bindung unterschiedlicher Adapterproteine, wie dem GTPase activating Protein (Gab), Ras (von Rat sarcoma) und den Src-homology 2 (SH2, abgeleitet von der Proteinkinase c-Src) enthaltenden Proteinen Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2) und Phospholipase C γ (PLC γ) [50, 51]. Die Adapterproteine vermitteln ihrerseits die Information an verschiedene mitogene Signalwege. Die ErbB Rezeptoren können MAP-Kinasen direkt über Grb2 oder indirekt über die Phosphotyrosin-bindende Domäne (PTB) des Shc-Adapter-Proteins aktivieren [51]. Darüber hinaus können sie auch die Phosphoinosid-3-Kinase (Pi3K) aktivieren [54]. Während alle ErbB Rezeptoren in der Lage sind MAP-Kinase-Wege zu aktivieren, können ErbB3 und ErbB4 direkt die regulatorische p85 Einheit der Pi3K binden und so den Akt-Signalweg effizient induzieren, ErbB1 und ErbB2 dagegen können die Pi3K nur indirekt aktivieren [50]. Alle mitogenen

Signalkaskaden münden in einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die den Zellzyklus regulieren [50]. Die Variabilität in der Zusammensetzung des ErbB Netzwerks ermöglicht der Zelle eine hohe Adaptationsfähigkeit gegenüber den verschiedensten auto- und parakrinen Einflüssen [51].

Die Rezeptoraktivierung wird durch Endozytose und anschließende lysosomale Degradation beendet, dabei wird die Dauer der Signaltransduktion vom aktivierenden Liganden und den am Dimer beteiligten Rezeptor-Typen bestimmt [50].

2.4 Besonderheiten der einzelnen ErbB Rezeptoren

ErbB1 und ErbB4 verfügen sowohl über eine Bindungsstelle für Liganden als auch über eine intakte Tyrosin-Kinase-Funktion. Im Unterschied dazu zeichnen sich ErbB2 und ErbB3 durch Besonderheiten aus [51]. Für ErbB2 konnte bislang kein endogener Ligand identifiziert werden. Eine Liganden-abhängige Aktivierung dieses Rezeptors ist somit nur nach Heterodimerisierung möglich [49]. Dennoch gilt der ErbB2 auf Grund seiner speziellen Konformation und seiner ausgeprägten katalytischen Aktivität als bevorzugter Bindungspartner für andere ErbB Rezeptoren [50, 51]. Der ErbB3 weist eine durch Genmutation entstandene defekte Tyrosin-Kinase auf und ist somit in der Signalweiterleitung auf einen Bindungspartner mit intakter Kinase-Funktion angewiesen [49]. Trotz dieser Einschränkungen wird den ErbB2/ErbB3 Dimeren die höchste Signalstärke zugeschrieben [50, 51].

3. Mitogene Signalwege der Zelle

Die Zelle hat ein großes Repertoire interagierender Signalwege, die den Zellzyklus regulieren. Dazu gehören sowohl proliferative als auch zytoprotektive und anti-apoptotische Signalwege. Das komplexe Zusammenspiel dieser Mechanismen bestimmt schließlich das Zellwachstum. Auch unter physiologischen Bedingungen existiert eine Vielzahl alternativer Wege, um die Proliferation und das Überleben der Zellen zu kontrollieren. Die Zelle wird so anpassungsfähig gegenüber äußeren Einflüssen [2]. Die verschiedenen redundanten Mechanismen werden allerdings auch von Tumorzellen ausgenutzt, um in erhöhtem Maße zu proliferieren [55]. Eine besondere Rolle in der Entstehung proliferativer Signale wird den MAP-Kinasen zugewiesen. Diese umfassen die Erk1/2, JNK und p38-Mitogen-aktivierte Kinasen [7]. Ein weiterer

wichtiger Signalweg führt über die Akt, die neben der Vermittlung zytoprotektiver Effekte auch Proliferation, Zellwachstum und Proteinsynthese beeinflussen kann [2, 56]. Beide Signalwege können durch verschiedene RTKs und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren reguliert werden und stellen somit einen möglichen Angriffspunkt für die Interaktion mit Opioiden dar [11, 57].

3.1 Erk1/2-Signalkaskade

Die Erk1/2 werden durch extrazelluläre Signale aktiviert und leiten die Information über eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren an den Zellkern weiter [58-60]. Im Gegensatz zu JNK und p38-Mitogen aktivierten Kinasen, die hauptsächlich mit Entzündungsvorgängen in Verbindung gebracht werden, spielen Erk1/2 eine bedeutende Rolle für die Regulation von Proliferation, Wachstum und Differenzierung der Zelle [61]. Tumorzellen nutzen unter anderem einen fehlregulierten Erk1/2-Signalweg, um schnelles Wachstum durch gesteigerte Proliferation zu erreichen. Veränderungen im Erk1/2-Signalweg oder in vorgeschalteten Systemen sind in über der Hälfte aller Tumoren zu finden [62].

Die Aktivierung von MAP-Kinasen erfolgt über eine Kaskade sequenzieller Phosphorylierungsschritte und beginnt mit der Phosphorylierung der MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAPKKK oder MEKK). Diese phosphoryliert ihrerseits eine MAP-Kinase-Kinase (MAPKK oder MEK), die schließlich eine MAP-Kinase, zum Beispiel die Erk1/2 aktiviert [63]. Die Erk1/2 befindet sich im inaktiven Zustand im Zytosol und kann nach Aktivierung entweder in den Zellkern eintreten und dort entsprechende Transkriptionsfaktoren aktivieren oder verschiedene zytosolische Zielproteine an Serin/Threonin-Resten phosphorylieren [63, 64]. Die Signalübertragung wird durch Dephosphorylierung oder Degradierung beendet [63]. Die Aktivierung des Erk1/2-Signalweges wird meist durch RTKs über Ras-GTPasen induziert [65], kann aber auch intrazellulär durch PLC erfolgen [51]. Ras-GTPasen aktivieren ihrerseits Raf (von rapidly accelerated fibrosarcoma oder rat fibrosarcoma), das in der Signalkette als MAPKKK fungiert und die MEK aktiviert [60, 62, 64, 65].

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren können den Erk1/2-Signalweg entweder indirekt über die Transaktivierung von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen [58, 66, 67], oder direkt durch die $\beta\gamma$ -Untereinheit über eine Pi3K-vermittelte Ras-Aktivierung induzieren [11].

3.2 Akt-Signaltransduktion

Ein weiterer wichtiger mitogener Signalweg der Zelle ist die Signaltransduktion über Akt. Dieser Signalweg reguliert Zellwachstum, Proliferation und Apoptose [56, 68]. Die Kontrolle der Apoptose ist nötig, um die Zelle an äußere Einflüsse anzupassen und um defekte Zellen auszusortieren. Tumorzellen weisen häufig eine pathologisch gesteigerte Akt-Aktivierung auf, die dem programmierten Zelltod entgegenwirkt und eine schnelle Proliferation ermöglicht [56].

Die Akt ist eine Serin/Threonin-Kinase, die in den drei verschiedenen Isoformen Akt1/PKB α , Akt2/PKB β und Akt3/PKB γ existiert [68]. Der Akt-Signalweg wird vor allem durch den „second messenger“ Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP₃) initiiert, der über eine Pi3K-vermittelte Phosphorylierung aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) entsteht [51, 69]. PIP₃ rekrutiert die Akt an die Zellmembran, wo diese durch Phosphorylierung aktiviert wird. Die Akt aktiviert ihrerseits spezifische Zielstrukturen, wie zum Beispiel Transkriptionsfaktoren und Bcl-2 Proteine (B-cell lymphoma-2 Proteine), die für das Eintreten der Zelle in die Apoptose eine Rolle spielen [56, 69]. Die verschiedenen Isoformen der Pi3K (Pi3K IA, IB, II und III) können sowohl durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (Pi3K IA, II) als auch durch die $\beta\gamma$ -Untereinheit von G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Pi3K IA und IB) aktiviert werden [69, 70]. Eine Möglichkeit die Akt-Signaltransduktion zu beenden, stellt die Phosphatase PTEN (Phosphatase und Tensin homolog) dar, die PIP₃ dephosphoryliert [56].

Der Akt-Signalweg kann über eine Aktivierung des mammalian Target of Rapamycin (mTOR) das Zellwachstum und durch Interaktion mit MAP-Kinase-Signalwegen die Proliferation beeinflussen. Das Eintreten der Zellen in den programmierten Zelltod wird durch Blockade proapoptotischer Proteine wie Bcl-2 und anderer Apoptose-auslösender Mechanismen gehemmt [56].

4. BT474 Zellen

BT474 Zellen wurden ursprünglich aus einem soliden, invasiven, ductalen Mammakarzinom einer 60-jährigen Patientin isoliert [71, 72]. Diese Zellen zeichnen sich insbesondere durch Überexpression von ErbB2, als Folge einer Genamplifikation, aus [73, 74]. Etwa 25-30% aller Mammakarzinome weisen pathologisch erhöhte ErbB2 Konzentrationen auf [75], die im Zusammenhang mit einem schnellen Fortschreiten der Tumorerkrankung, einer erhöhten

Tumorzellproliferation und einem ungebremsten Tumorwachstum stehen [3]. Die ErbB2 Überexpression korreliert darüber hinaus mit einem erhöhten Metastasierungsrisiko, einer schnelleren Resistenzentwicklung gegenüber Chemotherapeutika, einer schlechteren Prognose und einer höheren Rückfallquote, wodurch sich ein Screening hinsichtlich des ErbB2 Status als prognostischer Marker etabliert hat [3, 49, 74]. Die Überexpression des ErbB2 macht die BT474 Zellen zu einem vielversprechenden Modell für in vitro Untersuchungen zur Entwicklung zielgerichteter antineoplastischer Therapiestrategien [73]. Beispiele für bereits entwickelte zielgerichtete Behandlungen sind die Anwendung monoklonaler Antikörper, die gegen spezielle extrazelluläre Strukturen überexprimierter ErbB Rezeptoren gerichtet sind. Ein solcher monoklonaler Antikörper ist Trastuzumab (Herceptin[®]), der an eine extrazelluläre Domäne des ErbB2 bindet [55]. Eine weitere Möglichkeit der gerichteten Einflussnahme stellen Inhibitoren der Kinase-Aktivität von RTKs dar, ein Beispiel hierfür ist Lapatinib (Tyverb[®]) [76]. BT474 Zellen weisen neben dem überexprimierten ErbB2 auch physiologische Konzentrationen an ErbB1 und ErbB3 und geringe Mengen an ErbB4 auf [3].

III FRAGESTELLUNG

Die mitogenen Signalwege der Zelle, die einerseits für Wachstum und Proliferation, andererseits für die Regulation des programmierten Zelltodes verantwortlich sind, stellen ein komplexes Netzwerk dar. Tumorzellen unterscheiden sich von gesunden Zellen insbesondere durch eine Deregulation der Wachstumskontrolle. Eine mögliche Ursache für eine gesteigerte Proliferation liegt in der Überexpression einzelner ErbB Rezeptoren, die gegenwärtig einen vielversprechenden Angriffspunkt für die Entwicklung spezifischer zielgerichteter Therapieansätze darstellen. Opioid-Analgetika, die häufig zur Behandlung starker Tumorschmerzen eingesetzt werden, können in neuronalen Zellen mit mitogenen Signalkaskaden interferieren. Das Ziel dieser Arbeit ist es daher, den Einfluss von Opioiden auf das Wachstumsverhalten von Tumorzellen mit einem deregulierten ErbB Netzwerk näher zu untersuchen.

Als Zellmodell wurden BT474 Mammakarzinomzellen gewählt, die durch Überexpression des ErbB2 und physiologische Konzentrationen an ErbB1 und ErbB3 charakterisiert sind.

Zunächst soll die Frage geklärt werden, ob sich die ausgewählten BT474 Zellen als Zellmodell für die Untersuchung spezifisch durch Opioid-Rezeptoren vermittelter Effekte auf das Wachstum von Tumorzellen eignen. Hierzu wurde die Expression und funktionelle Charakterisierung von endogenen Opioid-Rezeptoren in BT474 Zellen vorgenommen.

Anschließend wurde der Einfluss spezifisch durch μ -Opioid-Rezeptoren vermittelter Effekte auf das Wachstumsverhalten und die zu Grunde liegenden Signalmechanismen in BT474 Zellen untersucht.

Schließlich soll die Zusammensetzung und Funktion des ErbB Rezeptor-Netzwerks als möglicher Angriffspunkt einer chronischen Morphin-Behandlung bestimmt werden.

IV MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1 Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Brutschrank	Modell 6000	Heraeus (Hanau)
Gefrierschrank	Liebherr Premium NoFrost Modell GNP 3666 Index 20F/001 -20°C	Liebherr Hausgeräte GmbH (Ochsenhausen)
Gefrierschrank	-80°C	GFL (Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel)
Sterilbank	Laminar Flow. Modell 6.12 S	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH (Sonnenbühl-Genkingen)
Wasserbad Zellkultur	Julabo 20B	Helmut Saur (Reutlingen)
Zentrifuge	Minifuge	Heraeus (Hanau)
Zentrifuge	Micro Rapid/K	Andreas Hettich GmbH & Co. KG (Tuttlingen)
Zentrifuge	Sorvall RC 6+	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Wasserbad		GLW (Gesellschaft für Laborbedarf mbH; Würzburg)
PCR-Cycler	T Professional BASIC	Biometra GmbH (Göttingen)
Gelelektrophoresekammer für Agarosegelelektrophorese	Easy Cast TM Modell B1	Owl, Separation Systems (Rochester, USA)
Anschlussgerät für Gelelektrophoresekammer		Biometra GmbH (Göttingen)
Semi-dry Blotter	Multiphor II	Pharmacia LKB
Gelgießstand für SDS-Gele		Bio-Rad Laboratories GmbH (München)

Gelelektrophoresekammer für SDS-Gelelektrophorese	Mini-Protean II	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Anschlussgerät für Semi-dry Blotter und Gelelektrophoresekammer	Power supply, Modell 1000/500	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Video-Densitometer	E.A.S.Y. RH-3	Herolab GmbH (Wiesloch)
Eismaschine	AF 100	Scotsman Ice Systems Frimont S.P.A. (Mailand, Italien)
Photometer	Genesys 10S UV-Vis Spectrometer	Thermo Scientific (Waltham, USA)
ELISA-Reader	Tecan spectra	Tecan Group Ltd. (Männedorf, Schweiz)
Autoklav	Systec 2540 EL	biomedis Laborservice GmbH (Gießen)
Sterilisator	UL50	Memmert GmbH & Co. KG (Schwabach)
Scintillationsmesssystem	LS 6500	Beckmann-Coulter (Krefeld)
Mikroskop Zellkultur	Labovert	Leitz (Wetzlar)
Microwelle	900 & Grill	SEVERIN Elektrogeräte GmbH (Sundern)
Schüttler	REAX 2000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach)
Thermomixer	compact	Eppendorf (Hamburg)
Schüttler	TPM-2	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Rüttelplatte	Mini Rocking Platform	Biometra GmbH (Göttingen)
Pipetten	1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl, 500-5000 µl	Eppendorf (Hamburg)
Ultraschall Processor	Vibra Cell TM	Sonics & Materials Inc. (Danbury, USA)
Zellhomogenisator	Kinematica [®] 8/EU 9452 220V 50Hz	Bachofer (Reutlingen)

1.2 Zellkultur

Verbrauchsmaterialien

<i>Produkt</i>	<i>Hersteller</i>
Zellkulturflaschen mit Vent Schraubkappen 75/150 cm ²	TPP [®] (Techno Plastic Products AG; Trasadingen, Schweiz)
Zellkultur Schalen Ø 60/100 mm	TPP [®] (Trasadingen, Schweiz)
Zellkultur Testplatten 6/12/24/96	TPP [®] (Trasadingen, Schweiz)
Zentrifugen Röhrchen (PP/Polypropylen) 15/50 ml	TPP [®] (Trasadingen, Schweiz)
Vakuum Filtrationssysteme 150 ml	TPP [®] (Trasadingen, Schweiz)
Nunc-immuno plate F96 maxisorp	Nunc A/S (Roskilde, Dänemark)
Deckgläser 24 x 32 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Objektträger 76 x 26 mm	Menzel Gläser (Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig)
Safe-Lock Tubes 1,5/2,0 ml	Eppendorf (Hamburg)
MultiGuardTM Barrier Tips 1-10/10- 100/100-1000 µl	Sorenson BioScience, Inc. (Salt Lake City, Utah, USA)
Serologische Pipetten 5/10/25 ml	Josef Peske GmbH & Co. KG (Aindlingen-Arnhofen)
Glaspasteurpipetten	Josef Peske GmbH & Co. KG (Aindlingen-Arnhofen)
Parafilm "M" [®] Laboratory film	Pechiney Plastic Packaging (Chicago, IL., USA)

Zellen, Zellkulturmedien und Additive

<i>Produkt</i>	<i>Hersteller</i>
BT-474 Human Breast Carcinoma cell line; Passage 32	CLS-Cell lines service (Eppelheim)
RPMI 1640	PAN-Biotech GmbH (Aidenbach)

DMEM	PAN-Biotech GmbH (Aidenbach)
DMEH	Selbst hergestellt aus DMEM (s. oben) und 25 mM Hepes (s. unten)
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories GmbH (Cölbe)
Trypsin-EDTA solution 1 x	PAN-Biotech GmbH (Aidenbach)
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (Phosphate buffered saline; PBS)	Selbst hergestellt (vgl. Puffer), für Zellkultur steril filtriert
Penicillin/Streptomycin	PAN-Biotech GmbH (Aidenbach)
Enrofloxacin	ICN Biomedicals Inc. (Aurora, USA)
Heregulin- β 1 (rhNRG-1- β /HRG- β 1, Extracellular domain, recombinant human; 377-HB)	R&D Systems (Minneapolis, USA)
Epidermal Growth Factor (rec EGF human)	Bachem AG (Bubendorf, Schweiz)
Insulin Solution, human (Recombinant, insulin at 10 mg/ml in 25 mM HEPES, pH 8,2)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Morphin-HCl	Merk Millipore GmbH (Schwalbach/Ts.)
Naloxon-HCl	Merk Millipore GmbH (Schwalbach/Ts.)

Gebrauchsfertige Lösungen

Produkt	Hersteller
First Strand cDNA Synthesis Kit #K1611	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
peqGOLD TriFast TM	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Annexin V-FITC Apoptosis Detection KIT	Bender MedSystems [®] (Lausen, Schweiz)
Cell Proliferation ELISA, BrdU colorimetric	Roche (Mannheim)
Trypan Blue Solution 0,4%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)

Kristallviolett Art.1408 (C ₂₅ H ₃₀ ClN ₃ ACS)	Merk Millipore GmbH (Schwalbach/Ts.)
Vecta Mount™ AQ Aqueous mounting Medium	Vector Laboratories, Inc. (Burlingame USA)
Complete Protease Inhibitor Mix	Roche (Mannheim)
Fluka Analytical Poly-L-lysine hydrobromide 70'000-150'000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)

1.3 Molekularbiologie, Proteinanalytik und Zytochemie

Verbrauchsmaterialien

<i>Produkt</i>	<i>Hersteller</i>
Safe-Lock Tubes 1,5/2,0 ml	Eppendorf (Hamburg)
PCR-Einzelgefäße mit angehängtem Deckel 0,2 ml (781300)	Brand GmbH & Co. KG (Wertheim)
Zählubes Minis®	Zinsser Analytic GmbH (Frankfurt am Main)
Microglasfilterpapier (Glass- Mikrofibre Discs grade MGB)	Muntkell & Filtrak GmbH (Bärenstein)
Pipettenspitzen 1-10/10-100/100-1000 µl	Josef Peske GmbH & Co. KG (Aindling-Arnhofen)
Ampuwa® Wasser für Injektionszwecke und andere Anwendungen (PCR-H ₂ O)	Fresenius Kabi AG (Bad Homburg)
Einmalküvetten PS halbmicro/1,6 ml	A. Hartenstein Gesellschaft für Labor- und Medizintechnik mbH (Würzburg)
Schraubtube 1,5/2,0 ml (APEX® Screw-Cap Microcentrifugation Tubes)	Josef Peske GmbH & Co. KG (Aindling-Arnhofen)
Hyperfilm™ ECL Hyperperformance chemiluminescence film	Amersham Biosciences UK Ltd. (Buckinghamshire, UK)
Immobilon™ PVDF Membran (Immobilon-P Transfer Membrane 0,45 µm)	Merk Millipore GmbH (Schwalbach/Ts.)
Electrode Paper Novablot (PKG/500) Filterpapier für Semi-Blotting	GE Healthcare Bio-Science AB (Uppsala, Schweden)

Chemikalien

<i>Produkt</i>	<i>Abkürzung</i>	<i>Hersteller</i>
Agarose Basic		AppliChem GmbH (Darmstadt)
Protein A-agarose		Thermo Scientific (Waltham, USA)
Ammoniumpersulfat	APS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Albumin, proteasefrei (bovin)	BSA	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Chloroform	CHCl ₃	Merk Millipore GmbH (Schwalbach/Ts.)
Dimethylsulfoxid	DMSO	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Dithiobis-(succinimidyl propionat)	DSP	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Dithiotreitol	DTT	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Dinatriumhydrogenphosphat	Na ₂ HPO ₄	Merk Millipore GmbH (Schwalbach/Ts.)
Essigsäureanhydrid	EAH C ₄ H ₆ O ₃	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Ethylenglycol-bis(β- Aminoethylether)-N,N,N',N'- Tetraessigsäure	EGTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Ethidiumbromid	EtBr	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Folin-Ciocalteu's Phenol Reagenz	Folin- Reagenz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Formaldehyd 37%	CH ₂ O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
3-Isobutyl-1-Methylxanthin	IBMX	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Kupfer-II-sulfat x 5 H ₂ O	CuSO ₄	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Kaliumchlorid	KCl	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Luminol (3-Aminophtalhydrazid)		Fluka (Teil der Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen)

Magnesiumchlorid	MgCl ₂	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Methanol	MeOH	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Natriumchlorid	NaCl	Calbiochem (Teil der Merk Millipore GmbH; Schwalbach/Ts.)
Natrium-Laurylsulfat	SDS	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
N-(2-Hydroxyethyl) piperazin-N'-(2- Etansulfonsäure)	HEPES	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Phenylmethylsulfonyl- Fluorid	PMSF	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Polyethylenglycol 6000	PEG	Merk Millipore GmbH (Schwalbach/Ts.)
Polyoxyethylen-Sorbitan- Monolaurat (Tween [®] 20)	Tween	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Salzsäure	HCl	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
SDS ultra pure	SDS C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Triethylamin	TEA	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
TRIS Ultra Qualität Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan	Tris C ₄ H ₁₁ NO ₃	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Triton X 100	(C ₁₄ H ₂₂ O(C ₂ H ₄ O) _n) (n=9-10)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Tetramethylbenzamidin	TMB	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin	TEMED	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Wasserstoffperoxid	H ₂ O ₂	Merk Millipore GmbH (Schwalbach/Ts.)

Puffer

<i>Bezeichnung</i>	<i>Abkürzung/ pH Wert</i>	<i>Zusammensetzung</i>
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (phosphate-buffered saline)	PBS pH=7,4	NaCl 140 mM KCl 3 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 8 mM KH ₂ PO ₄ 1,5 mM Aq. Bidest.
Tris-Acetat-EDTA-Puffer; Laufpuffer Agarose-Gelelektrophorese	TAE	Tris 0,04 M Eisessig 0,02 M Na ⁺ EDTA 0,001 M Aq. Bidest
Elektrophoresepuffer (SDS-Gelelektrophorese)		Tris 0,025 M Glycin 0,2 M SDS 0,003 M Aq. Bidest.
Tris 1,25 M	pH=6,8	Tris 1,25 M Aq. Bidest.
Tris 1,5 M	pH=8,8	Tris 1,5 M Aq. Bidest.
Tris 5mM	pH=7,4	Tris 5mM Aq. Bidest.
Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween (Tris-buffered saline and Tween)	TBS/T pH=8,0	Tris 0,025 M NaCl 0,19 M Tween 20 0,1% Aq. Bidest.
Tris-Magnesium-Puffer	TM-Puffer pH=7,4	Tris 50 mM MgCl ₂ 5 mM Aq. Bidest.
Resolving-Puffer	Strip-Puffer pH=2,0	NaH ₂ PO ₄ 0,1 M Aq. Bidest.

Homogenisierungs-Puffer	HB pH=7,4	Tris 5 mM EGTA 1 mM DTT 1 mM Aq. Bidest.
Tris-Natrium-Puffer	TN-Puffer pH=7,4	Tris 5mM NaCl 100 mM Aq. Bidest.
Coating Puffer (ELISA)	pH=9,4	Na ₂ CO ₃ 10 mM NaHCO ₃ 35 mM Aq. Bidest.
Blocking Puffer (ELISA)	pH=6,0	Natriumacetat 0,05 M BSA 1% Aq. Bidest.
Assay Puffer (ELISA)	pH=6,0	Natriumacetat 0,05 M BSA 5% Aq. Bidest
Waschpuffer (ELISA)	pH=7,4	Na ₂ HPO ₄ 10 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tween 20 0,1%
Substratlösung A (ELISA)		H ₂ O ₂ -Harnstoff 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ 130 mM Citronensäure 49 mM Aq. Bidest.
Substratlösung B (ELISA)		TMB (3,3',5,5'- Tetraethylbenzidin) 2,08 mM Citronensäure 49 mM Aq. Bidest
Kupfersulfat-Tartrat- Natriumcarbonat	CTC	CuSO ₄ x 5 H ₂ O 0,1% Na ⁺ /K ⁺ - Tartrat 0,2% Na ₂ CO ₃ 10% Aq. Bidest.

Anodenpuffer I (Western Blot)	pH=10,4	Tris 0,25 M MeOH 100 ml Aq. Bidest. 400 ml
Anodenpuffer II (Western Blot)	pH=10,4	Tris 0,025 M MeOH 100 ml Aq. Bidest. 400 ml
Kathodenpuffer (Western Blot)	pH=7,6	E-amino-n-capronsäure 2,6 g MeOH 100 ml Aq. Bidest. 400 ml

Gebrauchsfertige Lösungen

Produkt	Hersteller
Pfu-DNA-Polymerase	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
6 x DNA Loading Dye	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
dNTP Set 100 mM Solutions	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
Roti®-Safe GelStain ready-to-use	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Roti®-Load1 Proteinauftragspuffer reduzierend, 4 x konz.	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1) Gebrauchsfertige, gasstabilisierte, wässrige 30% Acrylamidstammlösung mit 0,8% Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Rotiszint® eco plus LSC-Universalcocktail	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)

Liganden, Stimulatoren und Inhibitoren

Produkt	Hersteller
[³ H]DAMGO (30-60 Ci/mmol)	Perkin Elmer (Rodgau)
Forskolin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)

Wortmannin	Calbiochem (Teil der Merk Millipore GmbH; Schwalbach/Ts.)
(-)-Epigallocatechin Gallate (EGCG) #324880	Calbiochem (Teil der Merk Millipore GmbH; Schwalbach/Ts.)
AG 825 #121765	Calbiochem (Teil der Merk Millipore GmbH; Schwalbach/Ts.)
AG 1478 #658548	Calbiochem (Teil der Merk Millipore GmbH; Schwalbach/Ts.)

DNA, Primer und Antikörper

DNA

<i>Bezeichnung</i>	<i>Beschreibung</i>	<i>Bezugsquelle</i>
mMOR	Muriner μ -Opioid-Receptor, in pcDNA 3.1(+)	Dr. Lei Yu (University of Minneapolis, USA)
rDOR	δ -Opioid-Receptor der Ratte, in pcDNA 3.1(+)	Dr. Graeme I. Bell (University of Chicago, USA)
hKOR	Humaner κ -Opioid-Receptor in pcDNA 3.1(-)	Dr. Graeme I. Bell (University of Chicago, USA)
cDNA BT474	komplementäre DNA durch reverse Transkription der RNA	Eigene Herstellung (s. unten)

Primer

<i>Target</i>	<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
AC1	hAC_1for hAC_1rev	MWG Biotech AG (Ebersberg)
AC2	hAC_2for hAC_2rev	MWG Biotech AG (Ebersberg)
AC3	hAC_3for hAC_3rev	MWG Biotech AG (Ebersberg)
AC4	hAC_4for hAC_4rev	MWG Biotech AG (Ebersberg)
AC5	hAC_5for hAC_5rev	MWG Biotech AG (Ebersberg)

AC6	hAC_6for hAC_6rev	MWG Biotech AG (Ebersberg)
AC7	hAC_7for hAC_7rev	MWG Biotech AG (Ebersberg)
AC8	hAC_8for hAC_8rev	MWG Biotech AG (Ebersberg)
AC9	hAC_9for hAC_9rev	MWG Biotech AG (Ebersberg)
MOR	rhMORfwd rhMORrev	metabion international AG (Martinsried)
DOR	mhDORfwd mhDORrev	metabion international AG (Martinsried)
KOR	hKORfwd hKORrev	metabion international AG (Martinsried)
GAPDH	GAPDH_fwd GAPDH_rev	First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)

Antikörper

<i>Zielantigen</i>	<i>Antikörper Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
G _i α ₂		Eigene Herstellung
G _i α ₃		Eigene Herstellung
G _s α		Eigene Herstellung
Gβ		Eigene Herstellung
G _{q/11} α		Gramsch Laboratories (Schwabhausen)
G ₁₂ α		Gramsch Laboratories (Schwabhausen)
G ₁₃ α		Gramsch Laboratories (Schwabhausen)
G ₁₄ α		Gramsch Laboratories (Schwabhausen)
ErbB1	EGF Receptor (D38B1) XP (R) Rabbit mAb #4267S	Cell Signalling (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main)

ErbB2	HER2/ErbB2 (29D8) Rabbit mAb #2165P	Cell Signalling (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main)
ErbB3	HER3/ErbB3 (1B2E) Rabbit mAb #4754S	Cell Signalling (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main)
ErbB4	ErbB-4 (C-18) sc-283, Lot #C0904 rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Heidelberg)
Erk1/2	p44/42 MAPK (Erk1/2) Rabbit Ab #9102	Cell Signalling (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main)
Phospho- Erk1/2 Thr202/Tyr204	P-p44/42 MAPK (T202/Y204) (20G11) Rabbit mAb #4376S	Cell Signalling (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main)
Akt	Akt (pan) (40D4) Mouse mAb #2920S	Cell Signalling (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main)
Phospho-Akt Ser 473	P-Akt (S473) Rabbit Ab #9271S	Cell Signalling (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main)
PARP Asp 214	PARP (46D11) mAb #9532	Cell Signalling (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main)
β-Tubulin	Beta-Tubulin Antibody #2146	Cell Signalling (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main)
Mouse-F _c	W402B 21575903 Anti- Mouse IgG HRP Conjugate	Promega (Madison, USA)
Rabbit-F _c	Anti-rabbit IgG HRP-linked Antibody #7074S	Cell Signalling (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main)

2. Methoden

2.1 Zellkultur

Wachstumsbedingungen

Standardwachstumsmedium:

- RPMI
- 10% FKS
- 100 IU/ml Penicillin
- 0,1 mg/ml Streptomycin
- 0,2% Enrofloxacin
- 0,02 mg/ml Insulin

Sofern nicht anders beschrieben, wurden alle Medien und Zusätze vor Gebrauch im Wasserbad auf eine Temperatur von 37°C erwärmt.

Die Kultivierung der BT474 Zellen erfolgte in oben beschriebenem Wachstumsmedium in Zellkulturflaschen mit Ventilationsdeckel und einer Bodenfläche von 75 cm² bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank. Das Medium wurde alle 2 Tage gewechselt und die Zellen routinemäßig alle 7 bis 10 Tage im Verhältnis 1:5 subkultiviert. Hierfür wurde das Medium mittels eines Vakuumsaugers abgenommen, die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen und anschließend mit 2 ml Trypsin/EDTA für 2 Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 10 ml Wachstumsmedium wurden die Zellen resuspendiert und mit frischem Wachstumsmedium verdünnt in die neuen Zellkulturflaschen überführt.

Für die unterschiedlichen Versuche wurden die Zellen entweder auf Flaschen mit 100 cm² Bodenfläche (Radioligandenbindung) oder in Testplatten mit 6 (Annexin V-Färbung), 12 (Erk1/2- und Akt-Stimulation), 24 (Kristallviolett-Assay, cAMP-Akkumulation) oder 96 Vertiefungen (BrdU-Assay) umgesetzt und bis zu Versuchsbeginn im Brutschrank inkubiert. Die jeweils ausgesäte Zellzahl ist den Beschreibungen der einzelnen Versuche zu entnehmen.

mRNA Isolation und cDNA Synthese

Für die Isolation von mRNA wurden Zellen aus einer Zellkulturflasche mit 75 cm² Bodenfläche eingesetzt. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen und anschließend mit 2 ml Trypsin/EDTA durch 2-minütige Inkubation im Brutschrank bei 37°C abgelöst. Nach Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 10 ml Wachstumsmedium wurden die Zellen resuspendiert und in ein 50 ml Zentrifugen-Röhrchen überführt. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 300 x g wurde der Überstand abgekippt. Die Isolation der mRNA erfolgte mit peqGOLD TriFastTM nach Protokoll des Herstellers: Das Zellpellet wurde in 8 ml Trifast aufgelöst, nach 5-minütiger Inkubation bei Rt wurden 1,6 ml Chloroform zugefügt und für 15 Sekunden geschüttelt. Nach weiterer Inkubation von 10 Minuten bei Rt folgte ein Zentrifugationsschritt von 5 Minuten bei 4°C und 12000 x g, wodurch eine Phasentrennung eintrat. Die nachfolgenden Schritte fanden auf Eis statt: Die obere wässrige Phase, welche die mRNA enthält, wurde abgenommen und in 1,5 ml Safe-Lock Tubes überführt. Pro eingesetztem 1 ml Trifast wurden 0,5 ml Isopropanol zugegeben und durch mehrmaliges Invertieren der Reaktionsgefäße gemischt. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis folgte eine Zentrifugation von 10 Minuten bei 4°C und 12000 x g. Der Isopropanolüberstand wurde abgekippt und es folgten zwei Waschschrte, bei denen das Pellet je in 1 ml 75% Ethanol durch vortexen resuspendiert und anschließend für 10 Minuten bei 4°C und 12000 x g abzentrifugiert wurde. Das für 10 Minuten an der Luft getrocknete mRNA-Pellet wurde in PCR-H₂O aufgenommen, die Konzentration bei $\lambda=260$ nm photometrisch bestimmt und in Aliquots bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Das Umschreiben der mRNA in cDNA erfolgte mittels cDNA Synthesis Kit nach Herstellerprotokoll:

Ansatz je 1,5 ml Reaktionsgefäß:

- Nukleasefreies Wasser: 8 µl
- Reaktionspuffer 5 x (250 mM Tris-HCl, pH=8,3, 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT): 4 µl
- dNTP Mix 10 mM: 2 µl
- Mult. Reverse Transkriptase: 2 µl (20 u/µl)
- RNase Inhibitor Ribolock: 1 µl (20 u/µl)

- Primer Oligo (dT)₁₈: 1 µl (100 µM; 0,5 µg/µl; 15A₂₆₀ u/ml)
- mRNA (wie oben beschrieben isoliert): 2 µl (1 µg/µl)

Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 37°C wurde die Reaktion durch 5-minütiges Erhitzen auf 70°C gestoppt. Anschließend wurde die Konzentration der cDNA bei $\lambda=260$ nm photometrisch bestimmt und die Probe bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Präparation von Zellmembranen

Zur Bestimmung der Rezeptormenge in BT474 Zellen wurden zunächst Zellmembranen isoliert. Hierfür wurden die Zellen in Zellkulturflaschen mit einer Bodenfläche von 100 cm² in Wachstumsmedium angezüchtet bis die gewünschte Konfluenz erreicht war. Das Medium wurde abgekippt und die Zellen mit 12 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden erneut 12 ml kalte PBS-Lösung zugegeben und die Zellen mit einem Zellschaber von der Bodenfläche gelöst. Nach gründlicher Resuspension wurden die Zellen in ein 50 ml Zentrifugen-Röhrchen überführt und für 10 Minuten bei 4°C und 300 x g zentrifugiert. Die folgenden Arbeitsschritte wurden im Eisbad durchgeführt: Zuerst wurde der Überstand abgekippt, das Zellpellet in 10 ml Homogenisierungspuffer resuspendiert und die Membranen mittels eines Zellhomogenisator hergestellt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt von 10 Minuten bei 4°C und 300 x g wurde der Überstand in ein frisches Zentrifugen-Röhrchen überführt und die Membranen für 30 Minuten bei 20000 x g und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde abgekippt und das Membranpellet im dicht verschlossenen Zentrifugen-Röhrchen bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C eingefroren.

Zellernte und Versuchsvorbereitung

Um die Zellen zu ernten, wurde das Zellmedium mittels Vakuumsauger entfernt und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin/EDTA dissoziiert und vom Boden der Zellkulturflasche durch 2-minütige Inkubation im Brutschrank abgelöst. Die Reaktion wurde mit 10 ml Wachstumsmedium gestoppt und die Zellen resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 50 ml Zentrifugen-Röhrchen überführt und für 10 Minuten bei 300 x g und einer Temperatur von 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgekippt und das Zellpellet in 2 ml Medium

resuspendiert. Es wurde jeweils das Medium verwendet, in welches die Zellen ausgesät werden sollten. Die Zellzahl wurde in einer Neubauer-Zählkammer (1:1 in Trypanblau) als Mittelwert aus mindestens 3 Zählungen bestimmt.

Um die Adhärenz der Zellen zu Versuchsbeginn zu gewährleisten, wurden die Zellen stets einen Tag vor Versuchsbeginn geerntet, gezählt und auf Zellkulturplatten ausgesät. Sofern nicht anders beschrieben, wurden die Zellen für die Versuche stets in einer Dichte von 1×10^5 Zellen/ml in Standardwachstumsmedium ausgesät, dies entspricht den unten angegebenen absoluten Zellzahlen pro Vertiefung:

<i>Plattentyp</i>	<i>Zellzahl pro Vertiefung</i>	<i>Medium pro Vertiefung</i>
Zellkultur Testplatten 6	4×10^5	4 ml
Zellkultur Testplatten 12	2×10^5	2 ml
Zellkultur Testplatten 24	1×10^5	1 ml
Zellkultur Testplatten 96	$2,5 \times 10^4$	0,25 ml

Folgten Versuchsansätze in denen die Zellen mit Wachstumsfaktoren behandelt wurden, enthielt das verwendete Medium alle oben genannten Inhaltsstoffe des Standardwachstumsmediums mit Ausnahme von Insulin für die Dauer der Vorbehandlung. Das Medium inklusive aller Inhaltsstoffe, die für den jeweiligen Versuch zugegeben wurden, wurde alle 2 Tage gewechselt.

Intrazelluläre cAMP-Akkumulation

Zur Bestimmung der intrazellulären cAMP-Akkumulation wurden die Zellen wie oben beschrieben geerntet, gezählt und in der angegebenen Dichte auf eine Zellkultur Testplatte mit 24 Vertiefungen in je 1 ml Standardwachstumsmedium pro Vertiefung ausgesät.

Nach Anwachsen der Zellen über Nacht wurde eine Hälfte der Platte mit Morphin ($10 \mu\text{M}$) behandelt, während die andere Hälfte unbehandelt blieb. Nach 5 Tagen wurde das Medium abgesaugt und zunächst mit $0,1 \text{ mM}$ IBMX in $0,5 \text{ ml}$ DMEH pro Vertiefung gewaschen, bevor die Zellen mit Forskolin ($1 \mu\text{M}$), Forskolin ($1 \mu\text{M}$) und Morphin ($10 \mu\text{M}$) oder Forskolin ($1 \mu\text{M}$) und Morphin ($10 \mu\text{M}$) mit

Naloxon (100 μM), jeweils gelöst in 0,25 ml DMEH mit 0,1 mM IBMX pro Plattenvertiefung stimuliert wurden. Kontrollzellen blieben unbehandelt. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei 37°C im Wasserbad wurde die Platte in ein Eisbad überführt und die Reaktion durch Zugabe von 0,75 ml 50 mM HCl pro Kavität gestoppt. Die Zellen wurden 30 Minuten im Eisbad belassen, um den Übertritt des intrazellulären cAMPs in den Überstand zu ermöglichen. Anschließend wurde eine 1:10 Vorverdünnung in Assay-Puffer in einer 24er Testplatte angesetzt und mit 50 μl einer Mischung aus TEA und EAH (im Verhältnis 3:1) je Kavität acetyliert. Die Zellkulturplatten wurden anschließend mit Parafilm verschlossen, bei -20°C eingefroren oder direkt für einen ELISA verwendet.

Bestimmung des Zellwachstums

Für die Proliferationsversuche mit Wachstumsfaktoren und Morphin wurden die Zellen wie oben beschrieben am Vortag geerntet, gezählt und in der angegebenen Zelldichte ausgesät. Für die Dauer der Versuche wurden die entsprechenden Substanzen in den unten aufgeführten Konzentration dem Versuchsmedium zugesetzt. Die chronischen Opioid-Effekte wurden nach einer 5-tägigen Vorbehandlung der Zellen mit Morphin (10 μM) evaluiert. Das Medium inklusive Wachstumsfaktoren und Morphin wurde soweit nicht anders beschrieben alle 2 Tage erneuert. Für die Proliferationsversuche wurden folgende Konzentrationen an Wachstumsfaktoren und Opioiden verwendet:

Wachstumsfaktoren:

- Heregulin- β 1: 40 ng/ml
- EGF: 100 ng/ml

Opioide:

- Morphin: 10 μM
- Naloxon: 100 μM

Zellwachstumsbestimmung mittels Kristallviolett-Assay

Um die Zellzahl nach Ablauf der Versuchsdauer zu bestimmen, wurden die Zellkerne mittels Kristallviolett angefärbt. Die Versuche wurden stets in 24er Testplatten durchgeführt. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen anschließend 2 x mit je 0,5 ml PBS pro Kavität gewaschen. Die Zellen wurden mit 0,25 ml Kristallviolett überschichtet und für 15 Minuten bei Rt inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Färbelösung abgenommen und die Zellen 5 x mit je 0,5 ml PBS pro Vertiefung von überschüssigem Farbstoff befreit. Die

Zellen wurden anschließend mit je 0,25 ml 0,1 M Citronensäure für 2 Stunden bei Rt auf einer Rüttelplatte lysiert und die Farbintensität anschließend nach 1:10 Verdünnung mit Aq. Bidest. photometrisch bei $\lambda=492$ nm bestimmt. Um das Zellwachstum während des 5-tägigen Versuchszeitraums zu erfassen, wurden die Versuchsergebnisse um die Zelldichte zu Versuchsbeginn korrigiert.

Bestimmung der Proliferationsrate mit BrdU

Um das Proliferationsverhalten der BT474 Zellen infolge einer Behandlung mit Wachstumsfaktoren und Opioiden zu untersuchen, wurde der BrdU-Proliferationsassay gewählt. Die Versuche wurden entsprechend den Herstellerempfehlungen durchgeführt: Zunächst wurden die Zellen geerntet und auf eine 96er Testplatte in Standardwachstumsmedium ausgesät. Am Folgetag wurde die eine Hälfte der Zellen mit Morphin behandelt, während die andere Hälfte unbehandelt blieb. Nach 5 Tagen wurden die Zellen mit Heregulin- $\beta 1$ und Morphin, verdünnt in einem Volumen von 0,1 ml Standardwachstumsmedium ohne Insulin, behandelt. Jeder Ansatz wurde in 3fach-Bestimmung durchgeführt. Zusätzlich wurde in jede Vertiefung der Platte 10 μ l Markierungsreagenz verdünnt in RPMI gegeben (Endkonzentration 10 μ M BrdU), bevor die Zellen für 2 Stunden im Brutschrank inkubiert wurden. Anschließend wurde das Medium entfernt und für 30 Minuten bei Rt je 0,2 ml Fixationslösung pro Kavität der Platte zugegeben. Nach Entfernen der Fixationslösung wurden die Zellen für 90 Minuten mit 0,1 ml einer anti-BrdU-POD Lösung inkubiert. Nachdem die Antikörperlösung entfernt wurde, wurden die Zellen 3 x gewaschen, bevor mit 0,1 ml Substratlösung pro Vertiefung bis zur Entwicklung der Farbreaktion inkubiert wurde. Schließlich wurde die Farbintensität bei einer Wellenlänge von $\lambda=405$ nm (Referenzfilter $\lambda=429$ nm) photometrisch bestimmt.

Stimulation der Erk1/2 und Akt

Für die Bestimmung der Aktivität der Erk1/2 und der Akt wurden die Zellen geerntet, gezählt und anschließend auf zwei 12er Testplatten in Standardwachstumsmedium ausgesät. Nachdem die Zellen über Nacht angewachsen sind, wurde eine Platte für 5 Tage mit Morphin behandelt, die zweite Platte blieb als Kontrolle unbehandelt. Nach 5 Tagen wurde das Medium abgesaugt und jede Kavität der Platte zunächst mit 1 ml DMEH mit 0,1% BSA gewaschen. Zur Stimulation wurden pro Vertiefung erneut je 0,5 ml DMEH mit

0,1% BSA und Heregulin- β 1, EGF, Morphin und Naloxon, wie bei den einzelnen Versuchen angegeben, zugefügt. Die Zellen wurden anschließend für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Platten direkt in ein Eisbad überführt, das Medium abgesaugt und die Reaktion durch Zufügen von 0,5 ml Auftragspuffer (Roti®-Load 1; verdünnt 1:4 in Aq. Bidest.) gestoppt. Anschließend wurden die Platten mit Parafilm verschlossen bis zum Zeitpunkt der Western Blot-Analyse bei -20°C gelagert.

Zur Aufklärung des Signalweges der Erk1/2 und der Akt wurden die Zellen nach dem Waschen in 1 ml DMEH mit 0,1% BSA je Vertiefung mit verschiedenen Proteininhibitoren für 30 Minuten vorinkubiert, bevor die Zellen wie oben beschrieben mit Wachstumsfaktoren und/oder Opioiden für 5 Minuten stimuliert wurden.

Folgende Inhibitoren wurden eingesetzt:

<i>Bezeichnung</i>	<i>Inhibierte Zielstruktur</i>	<i>Konzentration</i>
AG1478	ErbB1	5 μ M
AG825	ErbB2	50 μ M
Wortmannin	Pi3K	1 μ M
EGCG	Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)	10 μ M

Darstellung der Apoptose mit Annexin V/Propidiumiodid-Färbung

Um den Effekt von Morphin auf das Auftreten von Apoptose zu bestimmen, wurden die Zellen mit Hilfe eines Annexin V-FITC Apoptosis Detection KIT angefärbt. Zuvor wurden die Zellen in 6er Zellkultur Testplatten mit je einem Poly-L-Lysin beschichteten Deckglas in Standardwachstumsmedium ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit Morphin, Morphin und Naloxon, Heregulin- β 1, Heregulin- β 1 mit Morphin sowie Heregulin- β 1 mit Morphin und Naloxon vorbehandelt. Entsprechende Kontrollzellen blieben unbehandelt. Nach 5 Tagen Vorbehandlung wurde das Medium entfernt, die Zellen 3 x mit je 1 ml PBS gewaschen, bevor die Färbung nach Angaben des Herstellers durchgeführt wurde. Dazu wurde rekombinantes humanes Annexin V/FITC 1:20 in Bindungspuffer verdünnt und zu den Zellen gegeben, gefolgt von einer 10-minütigen Inkubation bei Rt in Dunkelheit. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit je 1 ml PBS

wurden die Zellkerne mit 1:10 in Bindungspuffer verdünntem Propidiumiodid (Endkonzentration 1 µg/ml) durch 10-minütige Inkubation bei Rt angefärbt. Nachdem die Zellen erneut 3 x mit PBS gewaschen wurden, folgte die Fixation in 2% Formaldehyd (Formaldehyd 37%, verdünnt in PBS) für 30 Minuten. Zum Schluss wurden die Zellen wiederum 3 x mit je 1 ml PBS gewaschen, bevor sie mit einem Tropfen Vecta MountTM auf Objektträgern eingebettet wurden. Die Zellen wurden mittels konfokaler Mikroskopie unter Verwendung eines 63x/1.4 Objektivs ausgewertet (Ölimmersion).

Bestimmung des PARP-Abbaus

Für den Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1 (PARP)-Assay wurden die Zellen geerntet, gezählt und auf zwei 12er Testplatten in Standardwachstumsmedium ausgesät. Ab dem nächsten Morgen wurde eine Platte für 5 Tage mit Morphin behandelt, die zweite Platte blieb als Kontrolle unbehandelt. Nach 5 Tagen wurde das Medium entfernt, jede Vertiefung mit 1 ml PBS gewaschen und den Zellen 2 ml Serum-reduziertes Medium (Zusammensetzung siehe unten) zugefügt. Dem Medium wurden Heregulin-β1, Morphin und Naloxon alleine oder in Kombination zugesetzt oder die Zellen blieben als Kontrolle unbehandelt. Die so behandelten Zellen wurden für 6 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert, bevor das Medium abgesaugt und die Reaktion mit 0,5 ml Proteinauftragspuffer (Roti[®]-Load 1, 1:4 verdünnt in Aq. Bidest.) pro Kavität der Platte gestoppt wurde. Die Proben wurden bis zur Durchführung des Western Blots mit Parafilm verschlossen bei -20°C aufbewahrt.

Das für die PARP-Bestimmung verwendete Medium mit reduziertem Serumgehalt setzte sich wie folgt zusammen:

Serum-reduziertes Medium:

- RPMI
- 0,5% FKS
- 100 IU/ml Penicillin
- 0,1 mg/ml Streptomycin
- 0,2% Enrofloxacin

2.2 Molekularbiologische, proteinanalytische und zytochemische Methoden

Polymerase-Kettenreaktion und Gelelektrophorese

Polymerase-Kettenreaktion

Die RT(Reverse Transkriptase)-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) wurde gewählt, um die Expression von Adenylylcyclasen (AC) und Opioid-Rezeptoren (OR) in BT474 zu bestimmen.

Alle Primer wurden mit Hilfe des „Pubmed Primer designing tools“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) erstellt. Insbesondere wurde darauf geachtet, dass die amplifizierten Fragmente mindestens ein Intron überspannen, um falsch positive Ergebnisse durch Amplifikation genomischer DNA auszuschließen. Im Falle der Opioid-Rezeptoren wurden zusätzlich Stellen gewählt, in denen die humane cDNA mit der jeweiligen Positivkontrolle (Maus/Ratte) homolog ist.

Zusammensetzung PCR Ansatz:

- Primer: 10 pmol je Vorwärts- und Rückwärtsprimer
- Template cDNA: 10 ng (cDNA der BT474 Zellen oder Plasmid-cDNA der entsprechenden Rezeptoren als Positivkontrolle)
- dNTP Mix: je 0,2 mM (Endkonzentration)
- Pfu DNA Polymerase: 1,25 u
- Buffer 10 x mit 20 mM MgSO₄: 5 µl
- Nukleasefreies Wasser: ad 50 µl

Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz mit PCR-H₂O anstelle des Templates angefertigt. Um die Integrität der verwendeten cDNA zu gewährleisten, wurde ein Fragment der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), welche als Haushaltsgen unabhängig vom Zelltyp, Zellzyklusstadium und äußeren Einflüssen konstitutiv exprimiert wird, amplifiziert.

Das Programm der PCR-Reaktion setzte sich zusammen aus einer initialen Denaturierungsphase von 3 Minuten bei 94°C, gefolgt von 30-35 Zyklen jeweils bestehend aus einer Denaturierung für 30 Sekunden bei 94°C, der Primeranlagerung (Annealing) für 30 Sekunden bei einer Temperatur 5°C unter

der jeweiligen Schmelztemperatur des verwendeten Primer-Paars und der Extensionsphase für 45 Sekunden bei 72°C. Die PCR-Reaktion schloss mit einer 5-minütigen Extensionsphase bei 72°C ab. Die jeweilige Annealing Temperatur (AT), sowie die genaue Anzahl der Zyklen und die Sequenz der verwendeten Primer sind der folgenden Tabelle zu entnehmen:

<i>Ziel</i>	<i>Vorwärts Primer</i>	<i>Rückwärts Primer</i>	<i>AT</i>	<i>Zyklen</i>
AC1	5'-CCGAGTTGGCATCAATG TTGGC-3'	5'-TCCTCAGTCACCTGGA TTCTGC-3'	56°C	35
AC2	5'-CAGCATCTCTTCAGACC TCGC-3'	5'-CCGGAATGGAGGCAA ACATG-3'	57°C	30
AC3	5'-GAAGACAAGTCCGAGA GAGAGC-3'	5'-TCTTCTACCACCTGAA TGTTGC-3'	57°C	30
AC4	5'-TCTCTCCAAC TTCATCA TCC-3'	5'-ACACTGATGAGAGGC AGAGACC-3'	56°C	35
AC5	5'-ACAGGAGCACAACATC AGCG-3'	5'-TGAAGAAGTCTATGG CGTTGGC-3'	58°C	30
AC6	5'-TATGACCTACTGCTTGG CGTCC-3'	5'-TAGTAGAGTTCATCAT TGCGGC-3'	57°C	30
AC7	5'-TGGTGCTCTTCAACCTC TCC-3'	5'-CTGTCTGGAGAGTGTA AGCAGG-3'	56°C	35
AC8	5'-TCGGCTCTGGTCCTCAT CAC-3'	5'-GTTCTTCAAGGGTATC GACTTG-3'	56°C	35
AC9	5'-GAGTTCGCCAAGGAGA TGATGC-3'	5'-TACAGGTAGGTCTTCA TCTGGC-3'	59°C	35
MOR	5'-ATGAAGACTGCCACCA ACATCTAC-3'	5'-GAAGAGAGGATCCAG TTGCAGAC-3'	60°C	30
DOR	5'-GATGCGCTGGCCACCA GCAC-3'	5'-GAACACGCAGATCTT GGTCAC-3'	58°C	30
KOR	5'-ACATTGCCGTGTGCCAC CCC-3'	5'-TGCCACCACCACCAGG ACCA-3'	60°C	30
GAP DH	5'-CAAGGTCATCCATGACA ACTTTG-3'	5'-GTCCACCACCCTGTTG CTGTAG-3'	58°C	30

Gelelektrophorese

Im Anschluss an die RT-PCR folgte eine Gelelektrophorese, um die amplifizierten Fragmente anhand ihrer Größe aufzutrennen.

Zusammensetzung des 1,5% Agarose Gels:

- 0,9 g Agarose
- 50 ml TAE-Laufpuffer
 - mehrmaliges Aufkochen in der Mikrowelle und Ersetzen der Verdampfungsverluste mit Aq. Bidest.
- 0,4 µg/ml EtBr

Die Gelstruktur bildete sich durch Abkühlen in einer Mini-Gelelektrophoresekammer, ein Kamm diente als Platzhalter für die Probenfächer. Die aufzutragenden Proben wurden mit 6 x DNA Loading Dye verdünnt und davon jeweils 20 µl pro Gelfächer aufgetragen. Zur Bestimmung der Fragmentlänge wurde ein 100 Basenpaar (bp) Marker verwendet. Die Gelelektrophorese fand in einer Gelelektrophoresekammer, gefüllt mit TAE-Laufpuffer, bei einer Stromstärke von 70 mA für 30-45 Minuten statt. Die Auswertung der amplifizierten Fragmente (Banden) erfolgte mit Hilfe eines Video-Densitometers unter UV-Licht.

Proteinbestimmung nach Lowry

Um die durch Radioligandenbindung bestimmte Rezeptormenge in Bezug zur Menge an Membranprotein setzen zu können, wurde eine Proteinbestimmung nach Lowry [77] durchgeführt. Die Testreagenzien setzten sich wie folgt zusammen:

Lowry Reagenz A:

- 3 ml CTC
- 3 ml 0,8 M NaOH
- 3 ml 10% SDS
- 3 ml Aq. Bidest.

Lowry Reagenz B:

- 0,5 ml Folin-Reagenz
- 2,5 ml Aq. Bidest.

Nach dem Vorbereiten der benötigten Lowry-Lösungen wurde eine Standardreihe im Doppelansatz mit definierten Proteinkonzentrationen von 0, 2,5, 5, 7,5 und 10 µg/ 0,1 ml BSA in Aq. Bidest. hergestellt. Für die Konzentrationsbestimmung der Proben wurden die Membransuspensionen auf Eis angetaut, in 0,1 ml TM-Puffer resuspendiert und im Doppelansatz jeweils 3 und 5 µl in 0,2 ml Aq. Bidest.

verdünnt. Allen Ansätzen (Standardreihe/Proben) wurden 0,4 ml der Lowry-A-Lösung zugesetzt, gemischt und die Proben anschließend für 10 Minuten bei Rt inkubiert. Im nächsten Schritt wurden allen Ansätzen 0,2 ml der Lowry-B-Lösung zugefügt, gemischt und die Proben für weitere 30 Minuten im auf 37°C vorgewärmten Wasserbad inkubiert. Danach wurden die Proben in Einmalküvetten überführt und die Farbreaktion bei $\lambda=550$ nm photometrisch bestimmt. Der Proteingehalt wurde anhand der Standardreihe ermittelt.

Radioligandenbindung

Die Zellmembranen wurden in 0,1 ml TM-Puffer resuspendiert. Für die Radioligandenbindung an den μ -Opioid-Rezeptor wurde [3 H]DAMGO (30-60 Ci/mmol) eingesetzt und jeder Ansatz in Dreifachbestimmung durchgeführt. In jedem 2 ml Reaktionsgefäß wurde ein Ansatz mit 0,2 ml vorbereitet, bestehend aus 160 μ l der in TM-Puffer resuspendierten Membranen (entsprechend 300 μ g Membranprotein), 20 μ l DAMGO (1 μ M) oder TM-Puffer und 20 μ l [3 H]DAMGO (entsprechend 15000 counts). Die Ansätze wurden gemischt und anschließend bis zum Einstellen des Equilibriums für 2 Stunden bei Rt inkubiert. Durch Zugabe von je 1 ml eiskaltem Puffer wurde die Reaktion gestoppt und ungebundene Liganden durch Filtration über Glasfaserfilter abgetrennt. Die Filter wurden zuvor durch 20-minütige Inkubation mit 0,1% PEG geblockt, um unspezifische Bindung zu vermeiden. Die Filter wurden nach Auftragen der Proben noch weitere 2 x mit je 1 ml TM-Puffer gespült, in Zählfläschchen überführt und mit je 3 ml Scintillationsflüssigkeit getränkt. Die membrangebundene Radioaktivität wurde nach 24-stündiger Extraktion im Scintillations-Messsystem bestimmt. Die spezifische Bindung von [3 H]DAMGO wurde aus der Differenz von Proben, denen nur [3 H]DAMGO zugesetzt war und solchen, in denen unmarkiertes DAMGO zur Verdrängung zugesetzt war, berechnet. Die maximale Bindungskapazität wurde mit Hilfe der spezifischen Bindung (B_0), der Dissoziationskonstante (K_D) und der Ligandenkonzentration (L) berechnet. Die Ligandenkonzentration wurde für jedes Experiment gesondert bestimmt. Die K_D für DAMGO am humanen μ -Rezeptor beträgt 1,4 nM [45]. Nach DeBlasi [78] kann die maximale Bindungskapazität (B_{\max}) dann mit folgender Formel berechnet werden:

$$B_{\max} = B_0 \times [(L+K_D)/L]$$

Durch die zugehörige Lowry-Proteinbestimmung konnte die berechnete Anzahl an Rezeptoren in Bezug zur Menge an Membranprotein gesetzt werden.

Western Blot

Mit Hilfe des Western Blots wurden die BT474 Zellen hinsichtlich ihres Gehaltes an G-Proteinen und ErbB Rezeptoren charakterisiert sowie die Aktivität der Erk1/2 und der Akt und das Auftreten von PARP-Abbauprodukten in den Zellen bestimmt.

Proben

Detektion der G-Proteine

Zur Bestimmung der G-Proteine wurden je 10 µg BT474 Membranprotein in 10 µl Proteinauftragspuffer (Roti®-Load 1) auf ein 10% SDS-Polyacrylamid Gel aufgetragen.

Bestimmung der ErbB Rezeptoren

Für den Western Blot wurden die Zellen von 3 Zellkulturflaschen mit einer Bodenfläche von je 75 cm² verwendet. Eine Flasche blieb unbehandelt, die zweite wurde mit Morphin und die dritte mit Morphin und Naloxon für jeweils 5 Tage behandelt. Danach wurden Zellmembranen wie oben beschrieben isoliert und eine Proteinbestimmung nach Lowry durchgeführt. Aus jedem Ansatz wurde eine Menge entsprechend 200 µg Membranprotein entnommen und im Eisbad mit je 1 ml eisgekühltem Aceton für 30 Minuten gefällt. Nach einer Zentrifugation von 10 Minuten bei 4°C und 6000 x g wurde der Überstand abgenommen, das Membranpellet kurz an der Luft getrocknet und in 100 µl Proteinauftragspuffer (Roti®-Load 1) aufgenommen. Eine Menge von 10 µl (entsprechend 20 µg Membranprotein) wurde in jede Geltasche eines 8% SDS-Gels aufgetragen.

Erk1/2- und Akt-Aktivitätsbestimmung sowie PARP-Degradation

Im Falle der Erk1/2- und Akt-Aktivitätsbestimmung und der Evaluation der PARP-Degradation wurden 10 µl der in Auftragspuffer solubilisierten Zellen eingesetzt.

Probenvorbereitung

Alle Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel zuerst 10 Sekunden mit Ultraschall behandelt, dann für 5 Minuten auf 95°C erhitzt und nach dem

Abkühlen für 10 Minuten bei 4°C und 5000 x g zentrifugiert.

SDS-Polyacrylamid Gele

10% Trenngel (für 2 Gele):

- 5 ml Rotiphorese® - Gel 30
- 3,75 ml 1,5 M Tris-HCl
- 0,15 ml 10% SDS
- 15 µl TEMED
- 75 µl APS
- 6,1 ml Aq. Bidest

8% Trenngel (für 2 Gele):

- 4 ml Rotiphorese® - Gel 30
- 3,75 ml 1,5 M Tris-HCl
- 0,15 ml 10% SDS
- 15 µl TEMED
- 75 µl APS
- 7,1 ml Aq. Bidest

Sammelgel (für 2 Gele):

- 1,7 ml Rotiphorese® - Gel 30
- 1 ml 1,25 M Tris-HCl
- 0,1 ml 10% SDS
- 20 µl TEMED
- 100 µl APS
- 7 ml Aq. Bidest

Zunächst wurde das Trenngel in einer Größe von 5 x 8 cm in eine Mini-Protean II Gelkammer gegossen und nach Auspolymerisierung mit einem Sammelgel der Größe 3 x 8 cm überschichtet. Ein Probenkamm diente als Platzhalter für die Auftragstaschen. Die Gele konnten anschließend über Nacht im Kühlraum bei 4°C vollständig auspolymerisieren.

Gelelektrophorese

Ein Volumen von 10 µl je Probe wurde pro Geldasche aufgetragen. Verbleibende Taschen wurden mit 10 µl Auftragspuffer befüllt. Die Gelelektrophorese wurde in einer mit Elektrophoresepuffer gefüllten Mini-ProteanII Gelelektrophoresekammer bei 100 V für 20 Minuten für den Durchlauf der Proben durch das Sammelgel und nachfolgend bei 200 V für 30 Minuten für die Auftrennung der Proteine im Trenngel durchgeführt.

Semi-Dry Blotting

Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend auf eine Polyvinylidenfluorid(PVDF)-Membran transferiert. Zwischen die befeuchteten Graphitplatten der Blot-Apparatur wurde ein Sandwich bestehend aus 6 in Anodenpuffer I getränkten Filterpapieren, 3 in Anodenpuffer II getränkten Filterpapieren, der für 10 Minuten in Methanol aktivierten PVDF-Membran, dem Elektrophoresegel und 9 in Kathodenpuffer getränkten Filterpapieren gelegt. Der Proteintransfer fand bei einer Stromstärke von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ für 2 Stunden statt.

Anschließend wurden die Membranen für 30 Minuten durch Inkubation mit RotiBlock[®] (1:10 in Aq. Bidest) unter Schütteln bei Rt geblockt, um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden.

Proteindetektion

Die Proteine wurden anschließend mittels Antikörperreaktion detektiert. Dafür wurden die Membranen zuerst über Nacht mit Protein-spezifischen Antikörpern (je nach Experiment) in TBS/T Puffer mit 0,1% BSA verdünnt (s. unten) bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Am Folgetag wurde, nach dreimaligem Waschen mit je 10 ml TBS/T Puffer für 10 Minuten, der 2. Antikörper (Anti-Rabbit oder Anti-Mouse, je nach erstem Antikörper) verdünnt in TBS/T mit 0,1% BSA zugegeben. Bei den zweiten Antikörpern handelt es sich um an Meerrettich-Peroxidase (Horseradish-Peroxidase/HRP)-gekoppelte Antikörper, die beispielsweise mittels Chemilumineszenz detektiert werden können. Nach 1-stündiger Inkubation mit dem 2. Antikörper bei Rt unter Rütteln folgten wieder 3 Waschschrte, bevor die Banden entwickelt wurden.

Der nachfolgenden Tabelle sind die verwendeten ersten und zweiten Antikörper und die jeweils eingesetzte Verdünnung zu entnehmen:

<i>Zielantigen</i>	<i>Verdünnung</i>
G _i α ₂	1:5000
G _i α ₃	1:2000
G _s α	1:4000
Gβ	1:5000
G _{q/11} α	1:2000
G ₁₂ α	1:2000

G ₁₃ α	1:2000
G ₁₄ α	1:2000
ErbB1	1:1000
ErbB2	1:1000
ErbB3	1:1000
ErbB4	1:1000
Erk1/2	1:2000
Phospho-Erk1/2 (Thr202/Tyr204)	1:2000
Akt	1:2000
Phospho-Akt (Ser473)	1:2000
PARP (Asp214)	1:1000
β-Tubulin	1:4000
Mouse-F _c	1:2000
Rabbit-F _c	1:2000

Visualisierung der Banden mit Chemoluminiszenz

ECL(enhanced chemiluminescence)-Lösung:

- 2,5 mM Luminol in DMSO
- 400 µM p-Cumarsäure in DMSO
- 100 mM Tris-HCl
- 2,7 mM 30% H₂O₂
- Aq. Bidest. ad 20 ml

Die Membranen wurden für 1 Minute in ECL-Lösung inkubiert und die durch Luminol-Aktivierung freigesetzte Energie auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht. Die Beurteilung erfolgte mittels Videodensitometer.

Reinigung der Membranen von anheftendem Antikörper (Strippen)

Um vergleichbare Ergebnisse der Gesamtmenge an Erk1/2 und Akt in Relation zur Menge an aktivierter, phosphorylierter Form zu erhalten, mussten beide Formen anhand der gleichen Proben bestimmt werden. Um an den zur Bestimmung der phospho-Erk1/2 und phospho-Akt angefertigten Blots die Gesamtmenge an Erk1/2 bzw. Akt mittels Inkubation mit spezifischen

Antikörpern detektieren zu können, mussten die Membranen zuerst von anhaftenden Antikörpern befreit werden. Das sogenannte „strippen“ der Blot-Membranen wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- 4 x Waschen für je 15 Minuten mit je 10 ml Strip-Puffer
- 2 x Waschen für je 10 Minuten mit je 10 ml Aq. Bidest.
- 10 Minuten Waschen mit 10 ml TBS/T
- 30 Minuten Inkubation mit RotiBlock® (1:10 in Aq. Bidest.)

Danach konnten die Membranen erneut mit einem spezifischen ersten Antikörper über Nacht bei 4°C unter Schütteln inkubiert werden.

Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zur Bestimmung des cAMP-Gehaltes des Zellüberstands wurde ein Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) durchgeführt. Der ELISA wurde in einer 96er Mikrotitrierplatte durchgeführt, die zuvor mit einem gegen Kaninchen-IgG gerichteten Antikörper der Ziege, der wiederum einen gegen cAMP gerichteten Antikörper aus dem Kaninchen gebunden hat, beschichtet wurde. Für den Versuch wurde eine Standardreihe als absteigende Verdünnungsreihe ausgehend von einer 10 µM cAMP-Standardlösung in Assay-Puffer angelegt und wie die Proben je 0,1 ml in Dreifachbestimmung auf die Vertiefungen der Platte aufgetragen. Die Proben wurden 1:10 in Assay-Puffer verdünnt. Zu den so beschickten Platten wurde anschließend ein cAMP-Peroxidase-Konjugat gegeben (1:5000 verdünnt in Assay-Puffer), die Platten mit Parafilm verschlossen und unter Schütteln bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde nach dreimaligem Waschen mit Wasch-Puffer die Substratlösung der Peroxidase (Substratlösung A und Substratlösung B im Verhältnis 1:1; 0,15 ml pro Kavität) zugegeben. Nach 5-minütiger Inkubation bei Rt unter Schütteln wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 1 M HCl pro Vertiefung gestoppt, die Farbreaktion bei $\lambda=450$ nm photometrisch gemessen und anhand der Standardkurve die Menge an cAMP bestimmt.

Co-Immunpräzipitation

Die in BT474 Zellen vorliegenden ErbB Rezeptor-Dimere wurden durch Co-Immunpräzipitation identifiziert. Die BT474 Zellen wurden für diesen Versuch in Zellkulturflaschen mit einer Bodenfläche von 75 cm² angezüchtet und für 5 Tage mit 10 µM Morphin behandelt. Kontrollen blieben unbehandelt. Die Zellen

wurden 3 x mit je 6 ml PBS gewaschen und anschließend mit Morphin (10 μ M) oder Heregulin- β 1 (40 ng/ml) für 10 Minuten bei 37°C in RPMI mit 0,1% BSA stimuliert. Die Zellen wurden in ein Eisbad überführt und erneut 3 x mit 6 ml PBS gewaschen, bevor die gebildeten ErbB Rezeptor-Dimere durch 2-stündige Inkubation mit 5 mM DSP in PBS kovalent vernetzt wurden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 mM Tris-HCl gestoppt und die Zellmembranen wie oben beschrieben isoliert. Die gebildeten Proteinkomplexe wurden in TN-Puffer mit 1% Triton X 100, 1 mM PMSF und 4% Complete Protease Inhibitor Mix für eine Stunde bei 4°C solubilisiert. Anschließend wurden die Proben 1:10 verdünnt und für 5 Minuten bei 10000 x g und 4°C zentrifugiert, bevor 2 μ l Anti-ErbB1 Antikörper (Verdünnung 1:500) und 40 μ l Protein A-Agarose (1:1) zugegeben und die Proben über Nacht im Kühlraum rotiert wurden. Am Folgetag wurden die Proben 5 x mit TN-Puffer mit 0,1% Triton X 100 und 1 x mit 5 mM Tris-HCl gewaschen. Anschließend wurden die Immunpräzipitate in je 0,1 ml Auftragspuffer aufgenommen und über ein 8% SDS-Gel aufgetrennt.

2.3 Datenauswertung

Alle Daten wurden als Mittelwerte mit Standardfehler aller unabhängigen Versuchsergebnisse dargestellt. Signifikante Unterschiede wurden mittels Student's t-Test ermittelt. Die abgebildeten Western Blots, die fotografische Darstellung des Kristallviolett-Tests sowie die konfokalen Aufnahmen sind jeweils repräsentativ für mindestens 3 unabhängige Versuche.

V ERGEBNISSE

1. Charakterisierung der BT474 Zellen

Im ersten Schritt wurden die BT474 Zellen als Modell für die Vermittlung intrazellulärer Signale nach akuter und chronischer Morphin-Behandlung charakterisiert. Zunächst wurde die Expression endogener Opioid-Rezeptoren und anschließend deren funktionelle Kopplung an nachgeschaltete Effektorwege bestimmt.

1.1 Endogene Opioid-Rezeptoren in BT474 Zellen

Die Ausstattung der BT474 Zellen mit endogenen Opioid-Rezeptoren wurde mittels RT-PCR untersucht. Als Template wurden je 10 ng der BT474 cDNA eingesetzt. Als Positivkontrolle dienten die klonierten Opioid-Rezeptoren in Plasmid pcDNA3.1. Als Negativkontrolle wurde eine Probe mit PCR-H₂O anstelle der Template DNA angefertigt. Die Integrität der verwendeten cDNA wurde durch Amplifikation eines 496 bp (Basenpaar) großen Fragments der GAPDH bestätigt. Um die Größe der gewonnenen Fragmente zu bestimmen, wurde ein 100 bp Marker aufgetragen.

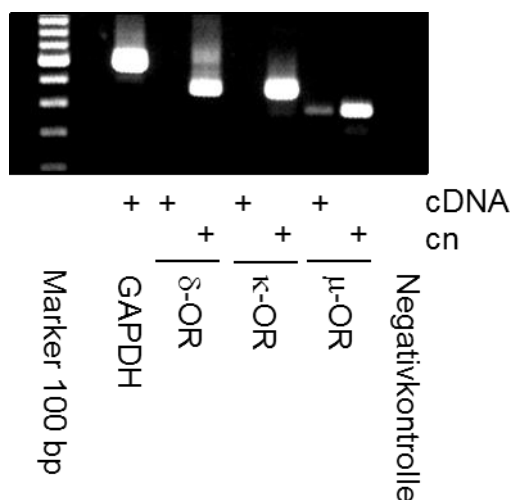


Abb. 4 Nachweis endogener Opioid-Rezeptoren in BT474 Zellen.

Von links nach rechts: Marker 100 bp; GAPDH: Bande bei 496 bp; δ -Opioid-Rezeptor: keine Bande bei cDNA der BT474 Zellen, Bande bei der Kontrollreaktion (cn) mit Plasmid-DNA bei 372 bp; κ -Opioid-Rezeptor: keine Bande bei BT474 cDNA, Bande bei Kontrollreaktion mit Plasmid-DNA bei 374 bp; μ -Rezeptor: positive Bande mit 293 bp sowohl bei BT474 cDNA als auch bei Plasmid-DNA; Negativkontrolle (PCR-H₂O).

Mittels RT-PCR konnten in BT474 Zellen nur Transkripte des μ -Opioid-Rezeptors, nicht aber des δ - oder κ -Opioid-Rezeptors identifiziert werden (Abb. 4).

1.2 Bestimmung der Rezeptormenge durch Radioligandenbindung

Mittels Radioligandenbindung wurde die Menge der Membran-gebundenen endogenen μ -Opioid-Rezeptoren bestimmt. [^3H]DAMGO diente in den Versuchen als Radioligand. In Membranen von Kontrollzellen (n=5) wurde eine durchschnittliche Rezeptormenge von $16,1 \pm 9,7$ fmol/mg Membranprotein gemessen. Nach chronischer Morphin-Behandlung (5 Tage, 10 μM) nahm die Rezeptordichte um etwa 40% auf $9,4 \pm 3,4$ fmol/mg Membranprotein ab (n=3).

1.3 Ausstattung der BT474 Zellen mit G-Proteinen

Die Funktion der μ -Opioid-Rezeptoren wird über G-Proteine vermittelt. Aus diesem Grund wurde die Anwesenheit verschiedener G-Proteine in Membran-Präparationen der BT474 Zellen mittels Western Blot untersucht. Die verschiedenen G-Proteine wurden mittels spezifischer Antikörper detektiert. Als Positivkontrolle dienten MCF-7 Zellen.

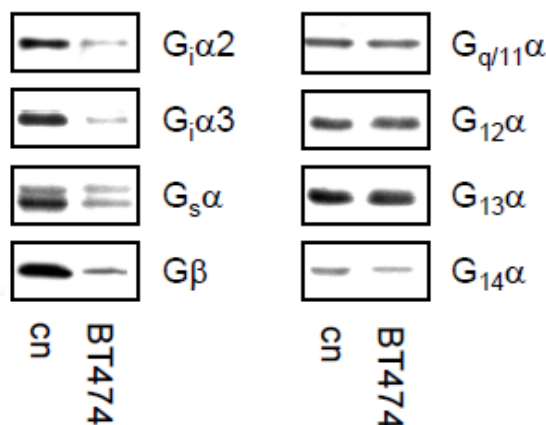


Abb. 5 G-Protein-Ausstattung der BT474 Zellen.

Repräsentative Western Blots für den Nachweis der G-Proteine. Links MCF-7 Zellen als Positivkontrolle (cn), rechts BT474 Zellen.

BT474 Zellen enthalten G_i - ($G_i\alpha 2$, $G_i\alpha 3$) sowie G_s - ($G_s\alpha$), G_q - ($G_{q/11}\alpha$) und G_{12} - ($G_{12}\alpha$, $G_{13}\alpha$, $G_{14}\alpha$) Proteine (Abb.5). Daraus ergibt sich für μ -Opioid-Rezeptoren die Möglichkeit, in BT474 Zellen verschiedene intrazelluläre Effektoren wie AC (über G_i), PLC (über G_q) und Rho-GTPasen (über G_{12} -Familie) zu regulieren.

1.4 Adenylylcyclasen als Effektorsysteme der Opioid-Rezeptoren

Um die Funktionalität der endogenen μ -Opioid-Rezeptoren in BT474 Zellen zu bestimmen, wurde die Regulation der intrazellulären cAMP-Produktion untersucht. Zuvor wurde das Vorhandensein einzelner Adenylylcyclase-Isoformen in BT474 Zellen mittels RT-PCR überprüft. Als Template dienten 10 ng der BT474 cDNA. Die verschiedenen Adenylylcyclase-Isoformen wurden mittels spezifischer Primer amplifiziert. Die Integrität der cDNA wurde durch Amplifikation eines 496 bp Fragments der GAPDH sichergestellt. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz mit PCR- H_2O anstelle der cDNA. Um die Fragmentlängen zu bestimmen, wurde ein 100 bp Marker aufgetragen. Die Ergebnisse werden in Abbildung 6 dargestellt.

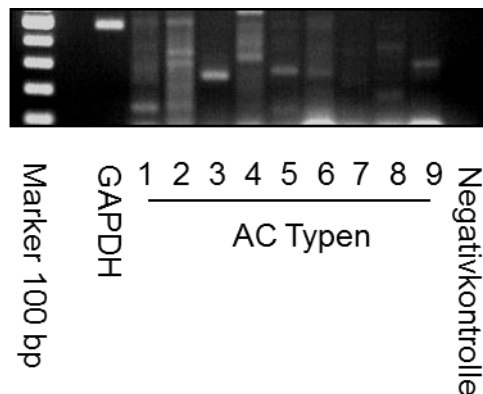


Abb. 6 Nachweis verschiedener Adenylylcyclase-Isoformen in BT474 Zellen.

Von links nach rechts: Marker 100 bp; GAPDH: spezifische Bande bei 496 bp; AC1: spezifische Bande bei 143 bp; AC2: spezifische Bande bei 323 bp; AC3: spezifische Bande bei 259 bp; AC4: spezifische Bande bei 368 bp; AC5: spezifische Bande bei 313 bp; AC6, AC7: unspezifische Banden; AC8: spezifische Bande bei 195 bp; AC9: spezifische Bande bei 325 bp; Negativkontrolle (PCR- H_2O).

1.5 Regulation der intrazellulären cAMP-Akkumulation

Die BT474 Zellen besitzen die folgenden AC-Isoformen: 1-5, 8 und 9. Somit ist in BT474 Zellen eine Regulation der intrazellulären cAMP-Akkumulation durch μ -Opioid-Rezeptoren zu erwarten. Diese wurde für einen Zeitraum von 15 Minuten in Anwesenheit von Forskolin (1 μ M), Morphin (10 μ M) und Naloxon (100 μ M) bestimmt.

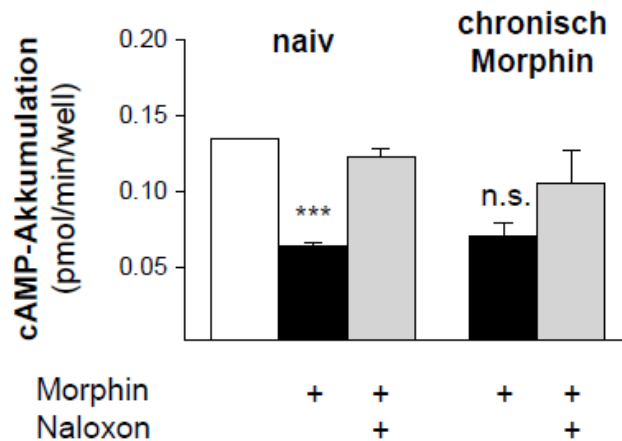


Abb. 7 Regulation der cAMP-Akkumulation in BT474 Zellen durch μ -Opioid-Rezeptoren.

In naiven Zellen: Eine 15-minütige Stimulation mit 10 μ M Morphin führt zu einem signifikanten Abfall der intrazellulären cAMP-Menge. Dieser Effekt wird durch 100 μ M Naloxon aufgehoben.

Nach chronischer Morphin-Behandlung: Eine akute Morphin-Stimulation bewirkt eine deutliche Abnahme der intrazellulären cAMP-Produktion im Vergleich zur Kontrolle. Dieser Effekt wird gehemmt durch gleichzeitige Behandlung mit Naloxon.

Mittelwerte \pm SE aus $n=3$ unabhängigen Versuchen., ***: signifikant für $p<0,001$; n.s.: nicht signifikant.

In Kontrollzellen führt die akute Aktivierung der μ -Opioid-Rezeptoren mit Morphin (10 μ M) zu einer Reduktion der cAMP-Produktion um 53%. Dieser Effekt wird bei gleichzeitiger Anwesenheit von Naloxon (100 μ M) aufgehoben. Obwohl die chronische Morphin-Behandlung der BT474 Zellen zu einer Abnahme der μ -Opioid-Rezeptoren führt (s. Radioligandenbindung), bewirkt die akute Stimulation mit Morphin auch in diesen Zellen eine Reduktion des intrazellulären cAMP-Gehaltes um 48%, die wiederum durch Naloxon aufhebbar ist. Diese Ergebnisse zeigen, dass BT474 Zellen intakte endogene μ -Opioid-Rezeptoren tragen, die auch nach einer chronischen Morphin-Behandlung voll funktionsfähig sind (Abb.7).

2. Interaktion von Opioiden mit dem Zellwachstum

Im Anschluss an den Nachweis funktioneller μ -Opioid-Rezeptoren in BT474 Zellen wurde eine mögliche Beeinflussung des Zellwachstums nach chronischer Exposition der Zellen gegenüber Morphin untersucht. Mittels Kristallviolett-Assay wurde das Zellwachstum nach 5-tägiger Behandlung der BT474 Zellen mit Morphin, Naloxon und dem Wachstumsfaktor Heregulin- β 1 bestimmt.

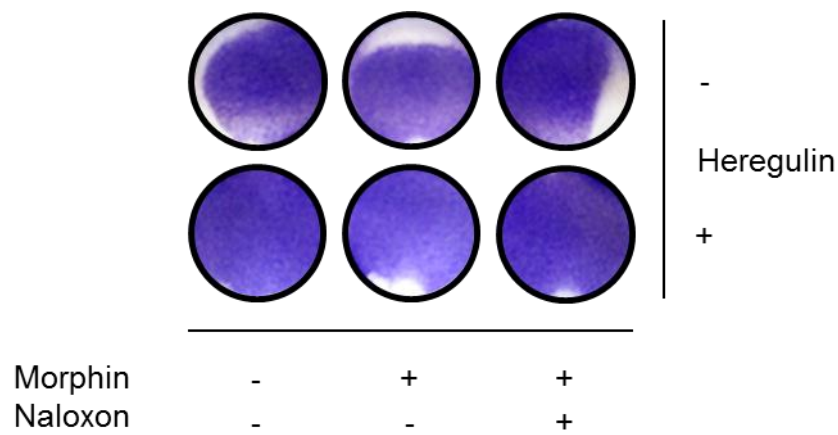


Abb. 8 Hemmung des Zellwachstums durch Morphin.

Die Abbildung zeigt eine repräsentative Aufnahme der mit Kristallviolett gefärbten BT474 Zellen nach 5-tägiger Behandlung mit Opioiden und/oder Heregulin- β 1 vor der Lyse und photometrischen Auswertung. Die Vorbehandlung für 5 Tage erfolgte mit Heregulin- β 1, Morphin, Morphin und Naloxon, Heregulin- β 1 mit Morphin, Heregulin- β 1 mit Morphin und Naloxon.

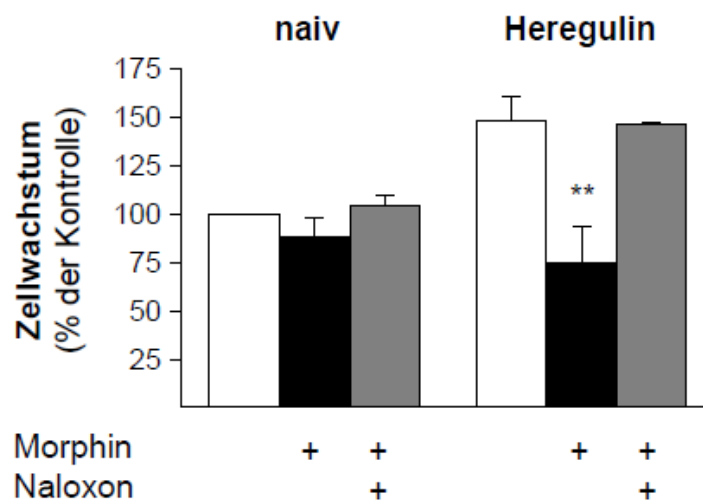


Abb. 9 Regulation des Wachstums der BT474 Zellen nach 5-tägiger Behandlung mit Opioiden und/oder Heregulin- β 1.

Naive Zellen: Die Exposition der Zellen gegenüber Morphin (5 Tage, 10 μ M) führt zu einer leichten Reduktion der Zellzahl. Dieser Effekt wird durch gleichzeitige Behandlung mit 100 μ M Naloxon aufgehoben.

Heregulin- β 1-vorbehandelte Zellen: Heregulin- β 1 (5 Tage 40 ng/ml) führt zu einem deutlichen Anstieg der Zellzahl im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Die gleichzeitige Behandlung mit Morphin hemmt diesen Anstieg. Der Morphin-vermittelte Effekt wird durch Naloxon aufgehoben.

Mittelwerte \pm SE normalisiert auf unbehandelte Kontrollen aus n=6 unabhängigen Versuchen; **: signifikant für $p < 0,005$.

Die chronische Behandlung der BT474 Zellen mit Morphin hemmt insbesondere bei gleichzeitiger Anwesenheit von Heregulin- β 1 das Zellwachstum (Abb.8). In naiven Zellen reduziert die chronische Behandlung der Zellen mit Morphin das Zellwachstum um 11%. Während die 5-tägige Behandlung der Zellen mit Heregulin- β 1 das Zellwachstum um 47% stimuliert, führt die gleichzeitige Inkubation der Zellen mit Morphin zu einer Reduktion des durch Heregulin- β 1 stimulierten Wachstums um 49% (Abb.9).

Die Aufhebung der Morphin-vermittelten Hemmung des Zellwachstums durch Naloxon und das Ausbleiben vergleichbarer Effekte auf das Zellwachstum bei Verwendung des inaktiven Stereoisomers (+)-Morphin (Ergebnisse nicht gezeigt) weisen auf einen durch μ -Opioid-Rezeptoren vermittelten Effekt hin und schließen indirekte Effekte durch die alkalischen Struktur des Morphins aus.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die chronische Morphin-Behandlung das Wachstum der BT474 Zellen hemmt. Die Wachstumshemmung ist am deutlichsten ausgeprägt bei gleichzeitiger Stimulation der Zellen mit dem Wachstumsfaktor Heregulin- β 1.

3. Beeinflussung der Proliferation durch Opiode

Die Hemmung des Wachstums der BT474 Zellen durch Morphin-Behandlung kann einerseits durch verminderte Proliferation der Zellen, andererseits durch gesteigerte Apoptose entstehen. Zunächst wurde eine Regulation der Zellproliferation durch Morphin mittels Erk1/2-Aktivierung und BrdU-Proliferationsassay bestimmt.

3.1 Aktivierung der Erk1/2 durch Opiode

μ -Opioid-Rezeptoren können sowohl direkt als auch indirekt durch Transaktivierung von RTKs den mitogenen Erk1/2-Signalweg induzieren. Aus diesem Grund wurde zunächst die Aktivierung der Erk1/2 nach 5-minütiger Stimulation der Zellen mit Morphin (10 μ M), Naloxon (100 μ M) und Heregulin- β 1 (40 ng/ml) mittels Western Blot bestimmt. Die phosphorylierte Form der Erk1/2 ist die aktivierte Form, die durch phospho-Erk1/2 spezifische Antikörper detektiert werden kann. Die Gesamtmenge der Erk1/2 wurde anhand der gleichen Blots mit einem pan-reaktiven Erk1/2-Antikörper bestimmt. Das Säulendiagramm zeigt die prozentualen Werte aller Versuche, bezogen auf Heregulin- β 1 stimulierte

Kontrollzellen (100%).

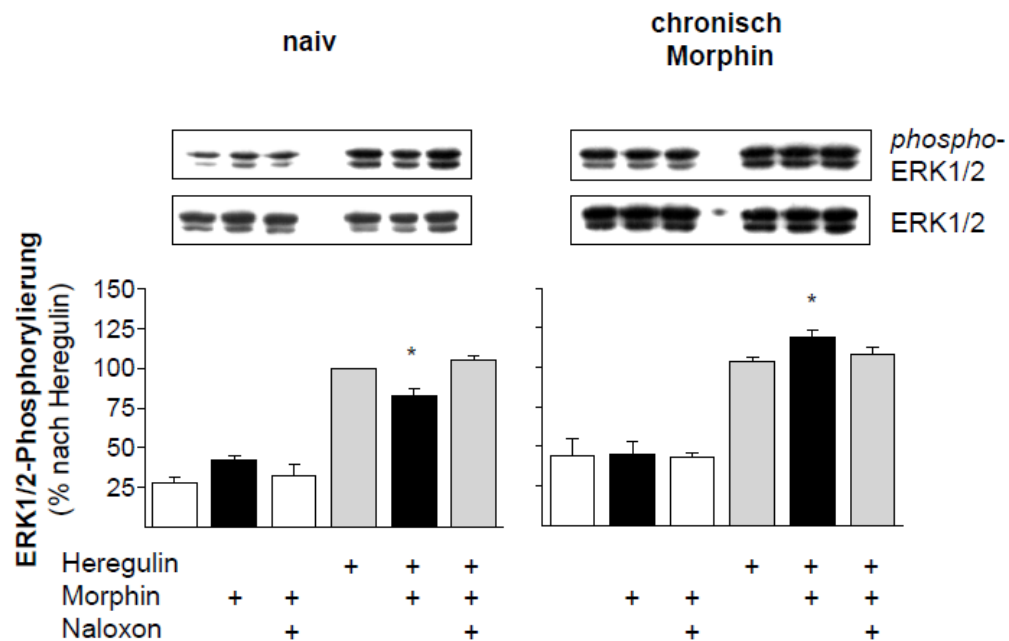


Abb. 10 Aktivierung der Erk1/2 durch Opiode.

Oben: Repräsentative Western Blots für die Erk1/2-Phosphorylierung.

Darstellung jeweils der phosphorylierten 42 und 44 kDa Form der Erk1/2 (phospho-Erk1/2), sowie darunter der absoluten Menge (Erk1/2) nach 5-minütiger Stimulation mit Morphin (10 μ M) mit und ohne Naloxon (100 μ M) und/oder Heregulin-β1 (40 ng/ml).

Unten: Auswertung aller phospho-Erk1/2 Versuche; links: naive Zellen, rechts: BT474

Zellen nach chronischer Morphinbehandlung; beide Diagramme zeigen von links nach rechts die Erk1/2-Phosphorylierung in Kontrollzellen, nach Stimulation durch Morphin, Morphin mit Naloxon, Heregulin-β1, Heregulin-β1 mit Morphin und Heregulin-β1 mit Morphin und Naloxon. Daten aus n=8 (naiv) bzw. n=6 (chronisch Morphin) unabhängigen Versuchen; Mittelwerte \pm SE; *: signifikant für p<0,05.

Die akute Stimulation naiver BT474 Zellen mit Morphin führt zu einem Anstieg der basalen Erk1/2 Phosphorylierung um 49%. Dieser Effekt wird durch die gleichzeitige Inkubation mit Naloxon aufgehoben.

Die Stimulation naiver BT474 Zellen mit Heregulin-β1 führt zu einem deutlichen Anstieg der Erk1/2-Phosphorylierung, der bei gleichzeitiger Behandlung mit Morphin signifikant vermindert (17%) wird. Auch dieser Morphin-vermittelte Effekt wird durch Anwesenheit von Naloxon aufgehoben.

Die chronische Morphin-Behandlung (5 Tage, 10 μ M) bewirkt eine Erhöhung der basalen Erk1/2-Phosphorylierung um 56% im Vergleich zu naiven Zellen. Ein Effekt auf die Erk1/2-Aktivierung durch zusätzliche akute Morphin-Stimulation wird dadurch maskiert. Heregulin-β1 führt auch in chronisch Morphin-

behandelten BT474 Zellen zu einem deutlichen Anstieg der Erk1/2-Phosphorylierung. Anders als in naiven Zellen, führt jedoch die gleichzeitige akute Stimulation mit Morphin zu einem zusätzlichen signifikanten Anstieg der Erk1/2-Phosphorylierung um 14%. Auch dieser Effekt wird durch Naloxon aufgehoben (Abb.10).

3.2 Bestimmung der Proliferationsrate mittels BrdU-Assay

Die Proliferationsrate naiver und chronisch Morphin-behandelter (5 Tage, 10 μ M) BT474 Zellen wurde für 2 Stunden in An- und Abwesenheit von Morphin (10 μ M) und Heregulin- β 1 (40 ng/ml) mittels BrdU-Proliferationsassay bestimmt.

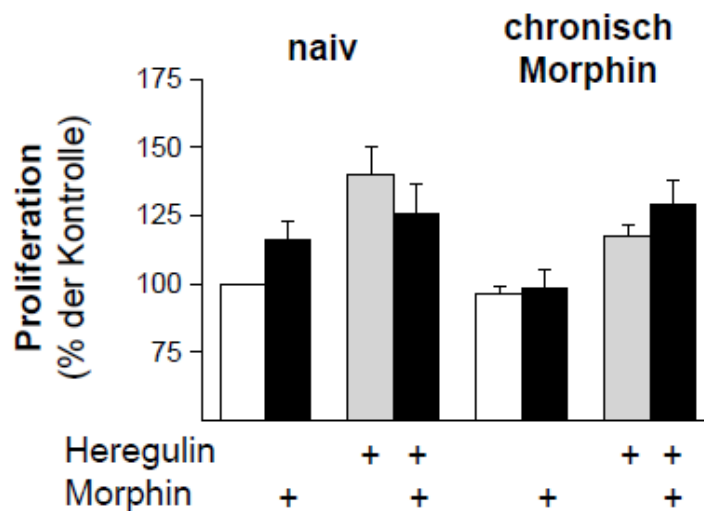


Abb. 11 Einfluss einer Morphin-Behandlung auf die Proliferationsrate der BT474 Zellen.

Links: naive Zellen; rechts: chronisch Morphin-behandelte Zellen; jeweils von links nach rechts: 2-stündige Inkubation ohne Zusatz, mit Morphin, mit Heregulin- β 1 und mit Morphin und Heregulin- β 1. Die Daten wurden normalisiert auf unbehandelte Kontrollzellen (100%). Auswertung aller angefertigten BrdU-Assays (Mittelwerte \pm SE, n=6).

In naiven Zellen stimuliert Morphin im Vergleich zu Kontrollzellen die Proliferation um 16%. Heregulin- β 1 führt zu einer deutlicheren Steigerung der Proliferation, die durch gleichzeitige Behandlung mit Morphin um 10% vermindert wird.

In chronisch Morphin-behandelten Zellen bleibt die basale Proliferationsrate unverändert, eine akute Stimulation mit Morphin hat keinen weiteren Einfluss. Die Stimulation der Zellproliferation durch Heregulin- β 1 ist im Vergleich zu naiven Zellen um 16% vermindert. Anders als in naiven Zellen wird jedoch die durch Heregulin- β 1 stimulierte Proliferationsrate durch gleichzeitige Behandlung

mit Morphin zusätzlich um 10% gesteigert (Abb.11).

4. Interaktion von Morphin mit dem Akt-Signalweg

Die Erhöhung der Morphin-stimulierten Proliferationsrate und Erk1/2-Phosphorylierung nach chronischer Morphin-Behandlung steht im Widerspruch zur Hemmung des Wachstums der BT474 Zellen (Kristallviolett-Assay). Aus diesem Grund wurde die Regulation des Akt-Signalweges untersucht. Die Akt-Aktivierung vermittelt zytoprotektive Effekte, insbesondere durch die Hemmung der Apoptoserate. Eine μ -Opioid-Rezeptor vermittelte Regulation des Akt-Signalwegs wurde wie für die Erk1/2 durch 5-minütige Stimulation von naiven und chronisch Morphin-behandelten Zellen (5 Tage, 10 μ M) mit Morphin (10 μ M), Naloxon (100 μ M) und Hergulin- β 1 (40 ng/ml) im Western Blot untersucht. Es wurde sowohl die aktivierte phosphorylierte Form der Akt als auch ihre Gesamtmenge mittels spezifischer Antikörper detektiert.

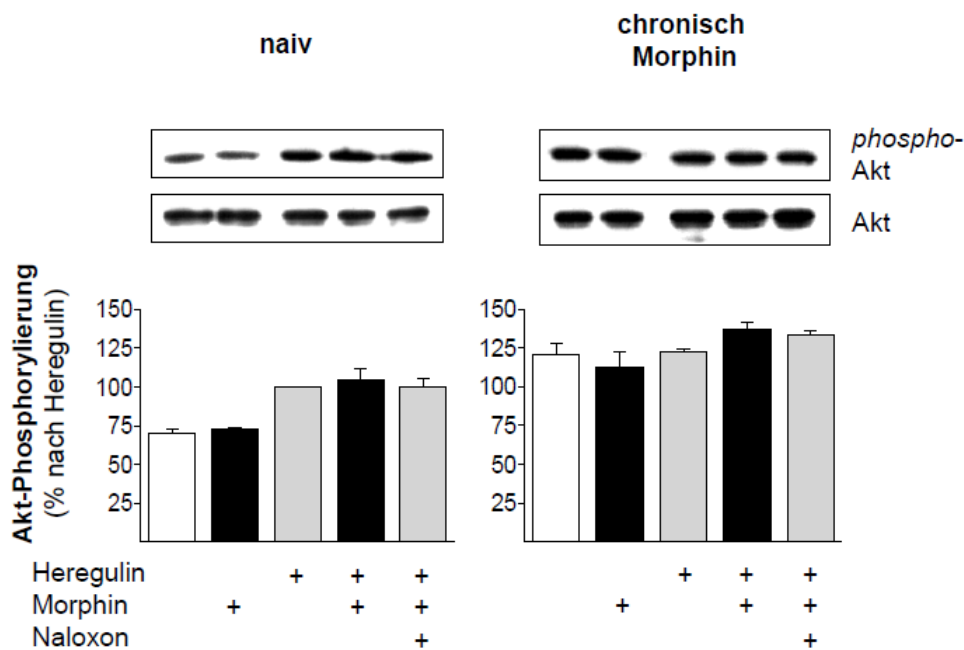


Abb. 12 Phosphorylierung der Akt nach Morphin-Behandlung.

Oben: Repräsentativer Western Blot der Akt (60 kDa) nach 5-minütiger Akt-Stimulation mit Morphin und Hergulin- β 1 in naiven (links) und chronisch Morphin-behandelten (rechts) Zellen nach Zugabe der gekennzeichneten Opioide bzw. Hergulin- β 1. Im oberen Teil abgebildet ist die aktivierte phosphorylierte Akt, darunter ist die Gesamtmenge an Akt dargestellt.

Unten: Auswertung aller Experimente. In naiven Zellen (linke Seite) und chronisch Morphin-behandelten Zellen (rechte Seite) nach Stimulation mit Morphin und Hergulin- β 1.

Mittelwerte \pm SE aus n=4 unabhängigen Versuchen, Werte normalisiert auf Hergulin- β 1 stimulierte naive Zellen (100%).

Wie Abbildung 12 zeigt, steigert Heregulin- β 1 die basale Phosphorylierung der Akt in naiven Zellen um 40%. Die chronische Morphin-Behandlung der BT474 Zellen führt zu einem Anstieg der basalen und der durch Heregulin- β 1 stimulierten Akt-Phosphorylierung. Eine akute Stimulation mit Morphin hat dagegen weder in naiven, noch in chronisch Morphin-behandelten BT474 Zellen Einfluss auf die Akt-Aktivierung, unabhängig von einer Stimulation durch Heregulin- β 1.

Die Tatsache, dass die chronische Morphin-Behandlung der BT474 Zellen mit einer erhöhten Akt-Phosphorylierung einhergeht, kann die im Kristallviolett-Assay beobachtete Hemmung des Zellwachstums nicht erklären.

5. Induktion der Apoptose durch Morphin

Neben einer verminderten Proliferation, kann eine gesteigerte Apoptose ebenfalls Ursache für die beobachtete Hemmung des Zellwachstums durch Opioide sein. Um den Einfluss von Opioiden auf das Eintreten der BT474 Zellen in den programmierten Zelltod zu bestimmen, wurde einerseits die Degradation der PARP bestimmt, andererseits wurde der Apoptosestatus mittels Annexin V/Propidiumiodid-Färbung dargestellt.

5.1 PARP Degradation in BT474 Zellen

Der proteolytische Abbau der Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1 (PARP) dient als Marker der Apoptose. In naiven und chronisch Morphin-behandelten Zellen wurde der Einfluss von Morphin (10 μ M) und/oder Heregulin- β 1 (40 ng/ml) auf die stressinduzierte Apoptose nach 6-stündigem Serumentzug durch Bestimmung der PARP-Degradation mittels Western Blot untersucht.

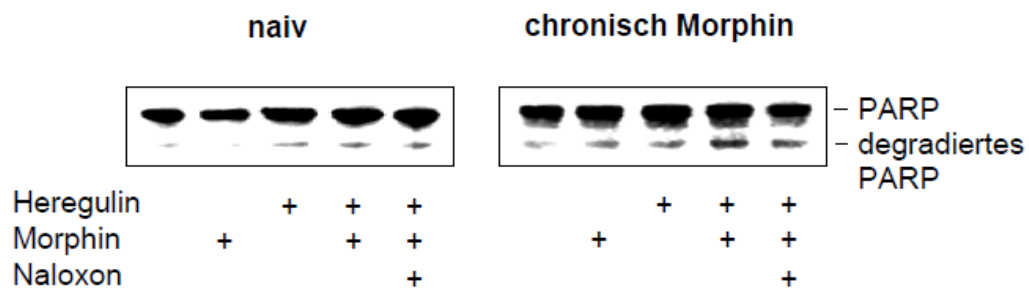


Abb. 13 Auftreten von PARP-Abbauprodukten nach Opioid-Behandlung.

Repräsentativer Western Blot zur Bestimmung des PARP-Abbaus.

In naiven Zellen (links) und chronisch Morphin-behandelten Zellen (rechts) jeweils nach 6-stündiger Inkubation mit Morphin und Heregulin- β 1 in serumfreiem Medium.

PARP: 116 kDa (obere Bande), degradiertes PARP: 89 kDa (untere Bande).

In naiven Zellen kann nach Morphin-Behandlung zwar PARP (116 kDa), nicht jedoch das initiale Abbauprodukt (89 kDa) detektiert werden. In Anwesenheit von Heregulin- β 1 dagegen tritt dieses Abbauprodukt in geringen Mengen auf.

Nach chronischer Morphin-Behandlung konnte in BT474 Zellen unabhängig von der Behandlung eine vermehrte PARP-Degradation im Vergleich zu Kontrollzellen festgestellt werden. Die Apoptose wird am effektivsten bei gleichzeitiger Anwesenheit von Morphin und Heregulin- β 1 induziert. Die Verstärkung der durch Heregulin- β 1 induzierten Apoptose durch Morphin wird bei gleichzeitiger Inkubation mit Naloxon aufgehoben. Dieses Ergebnis stimmt mit der Beobachtung überein, dass im Kristallviolett-Assay das Zellwachstum bei simultaner Behandlung mit Morphin und Heregulin- β 1 am stärksten gehemmt wurde (Abb. 13).

5.2 Annexin V/Propidiumiodid-Färbung

Die Annexin V/Propidiumiodid-Färbung wurde durchgeführt, um die Induktion der Apoptose in BT474 Zellen nach chronischer Opioid-Behandlung (10 μ M, 5 Tage) zu bestätigen. Annexin V bindet an Phosphatidyl-Serin, das in frühen Stadien der Apoptose auf der Zelloberfläche präsentiert wird. Propidiumiodid kann den Zellkern nur dann anfärben, wenn die Zell- und Kernmembran im fortgeschrittenen Stadium des Zelltodes für diesen Farbstoff durchlässig wird.

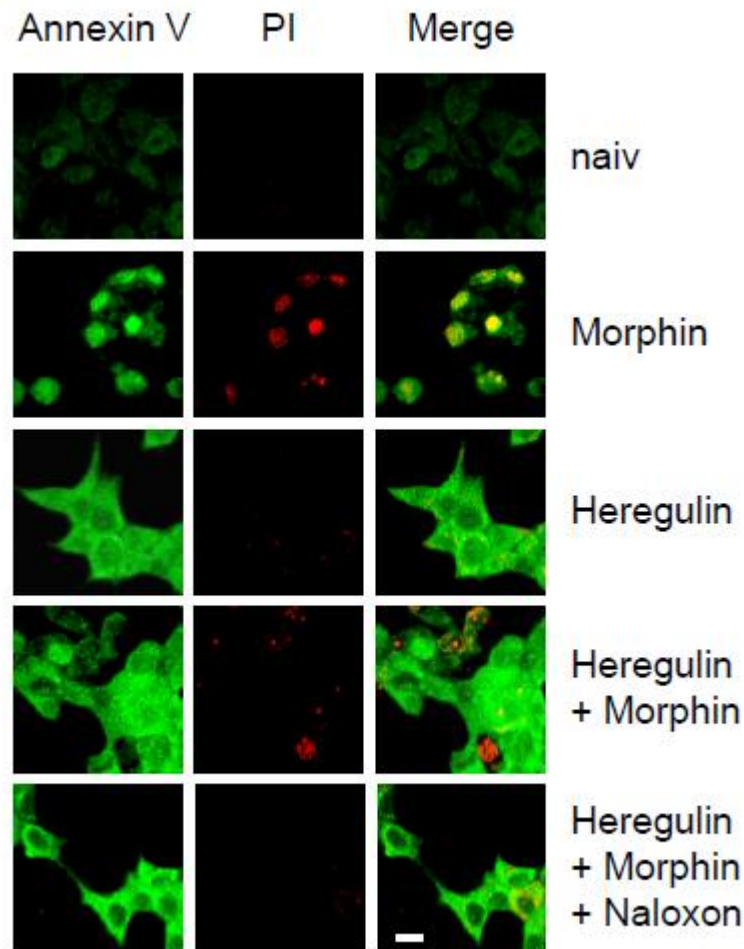


Abb. 14 Induktion der Apoptose in BT474 Zellen durch Morphin.

Konfokale Aufnahmen repräsentativer Annexin V/Propidiumiodid-Färbungen der BT474 Zellen. Von oben nach unten: abgebildet sind Zellen, die nicht (naiv), 5 Tage mit 10 μM Morphin, 5 Tage mit 40 ng/ml Heregulin- $\beta 1$, 5 Tage mit Morphin und Heregulin- $\beta 1$ und 5 Tage mit Morphin, Heregulin- $\beta 1$ und Naloxon (100 μM) vorbehandelt wurden. Die linke Reihe zeigt die Annexin V-FITC-Färbung (grün), in der mittleren Reihe ist die zugehörige Propidiumiodid-Färbung (rot) und rechts eine Überlagerung beider Aufnahmen abgebildet. Balken: 20 μm .

Abbildung 14 zeigt, dass naive Zellen kaum Annexin V binden, während chronisch Morphin-behandelte Zellen sowohl eine deutliche Anlagerung von Annexin V an die Zellmembran als auch eine deutliche Einlagerung von Propidiumiodid in den Zellkern aufweisen. Dies weist darauf hin, dass sich vermehrt Zellen in fortgeschrittenen Apoptosestadien befinden.

Die Behandlung der Zellen mit Heregulin- $\beta 1$ führt ebenfalls zu einer deutlicheren Anfärbbarkeit durch Annexin V, jedoch nicht zu einer Einlagerung von Propidiumiodid. Die Zellen befinden sich demnach vermehrt in frühen Apoptosestadien.

Bei gleichzeitiger Behandlung der Zellen mit Morphin und Heregulin- β 1 zeigen die Zellen wieder zusätzliche Propidiumiodid-Einlagerung als Hinweis der Induktion fortgeschrittener Apoptosestadien. Diese Ergebnisse stimmen mit der PARP-Degradation überein und zeigen, dass Morphin vor allem in Anwesenheit von Heregulin- β 1 eine ausgeprägte apoptotische Wirkung besitzt. Die Apoptose-Induktion durch Morphin ist durch gleichzeitige Inkubation mit Naloxon aufhebbar, dies spricht für einen Opioid-Rezeptor vermittelten Effekt.

In BT474 Zellen gehen mit der Induktion der Apoptose auch morphologische Veränderungen der Zellen nach Behandlung mit Morphin und Heregulin- β 1 einher. Während unbehandelte BT474 Zellen ein epitheliales Erscheinungsbild zeigen, führt die Morphin-Behandlung zu einem Abrunden der Zellen und zur Ausbildung von Synzytien. Im Gegensatz dazu führt die Behandlung mit Heregulin- β 1 zu einer Differenzierung der Zellen, erkennbar durch das Erscheinungsbild in Form einzelner polygonaler Zellen mit Ausläufern. Die Zugabe von Morphin hebt die durch Heregulin- β 1 induzierte Differenzierung auf und führt wieder zum Abrunden der Zellen und zur Ausbildung von Synzytien. Bei zusätzlicher Inkubation mit Naloxon werden die durch Morphin ausgelösten morphologischen Veränderungen wiederum aufgehoben.

Die Ergebnisse der PARP-Bestimmung und der Annexin V-Färbung zeigen, dass die Wachstumshemmung durch chronische Morphin-Behandlung auf verstärkter Apoptose der BT474 Zellen nach chronischer Morphin-Behandlung zurückzuführen ist.

6. Durch chronische Morphin-Behandlung induzierte Veränderungen im ErbB Signalweg

Die Veränderungen in der μ -Opioid-Rezeptor vermittelten Regulation der Erk1/2- sowie der Akt-Aktivität nach chronischer Morphin-Behandlung wurden mittels verschiedener Proteininhibitoren untersucht.

6.1 Untersuchung des Mechanismus der Erk1/2-Aktivierung

Die Beteiligung der verschiedenen ErbB Rezeptor-Typen und nachgeschalteter Signalmoleküle an der Weiterleitung mitogener Opioid-Signale wurde mittels Western Blot untersucht. Die Erk1/2-Phosphorylierung nach 5-minütiger Stimulation mit Heregulin- β 1 wurde in BT474 Zellen ohne Vorbehandlung (naiv)

und nach chronischer Morphin-Behandlung (5 Tage, 10 μ M) bestimmt. Vor der Stimulation wurden die Zellen eine halbe Stunde mit verschiedenen Proteininhibitoren inkubiert.

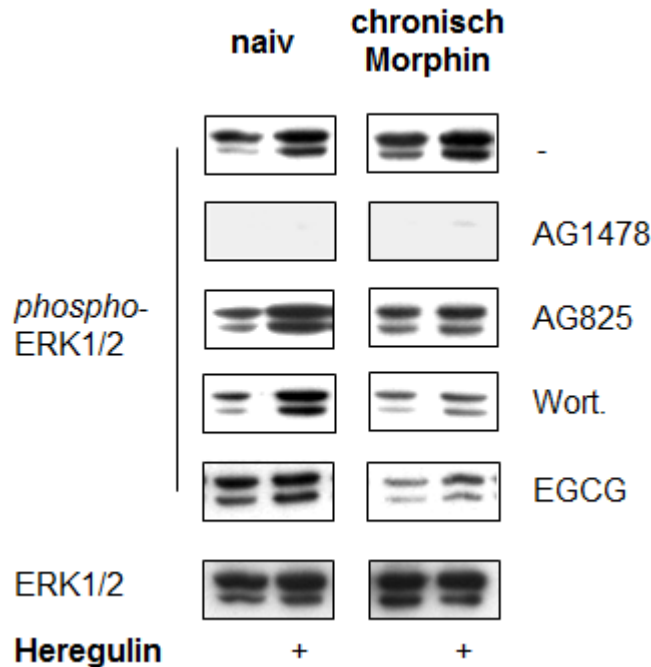


Abb. 15 Auswirkungen der Inkubation mit Proteininhibitoren auf die durch μ -Opioid-Rezeptoren vermittelte Erk1/2-Phosphorylierung.

Repräsentative Western Blots der Erk1/2-Phosphorylierung nach Inkubation mit verschiedenen Proteininhibitoren. Naive (links) und chronisch Morphin-behandelte (rechts) BT474 Zellen nach Vorbehandlung mit folgenden Inhibitoren (von oben nach unten): Kontrolle ohne Inhibitor; AG1478 (ErbB1 Inhibitor); AG825 (ErbB2 Inhibitor); Wortmannin (Pi3K Inhibitor); EGCG (Inhibitor der MMPs); Gesamtmenge an Erk1/2.

Die Behandlung mit dem ErbB1 Inhibitor AG1478 führt zur vollständigen Hemmung der basalen und durch Heregulin- β 1 stimulierten Erk1/2-Phosphorylierung sowohl in naiven als auch in chronisch Morphin-behandelten Zellen. Die Vorinkubation mit AG825 vermindert die Erk1/2-Phosphorylierung dagegen nur in chronisch Morphin-behandelten Zellen nach Stimulation mit Heregulin- β 1. Die Inhibition der Pi3K durch Wortmannin, sowie die Inhibition der Matrix-Metalloproteinasen durch EGCG resultiert in einer verminderten Erk1/2-Aktivierung in chronisch Morphin-behandelten Zellen, insbesondere nach Stimulation durch Heregulin- β 1 (Abb.15).

Die gewonnenen Ergebnisse implizieren, dass der ErbB1 essentiell für die basale und durch Heregulin- β 1 stimulierte Aktivierung der Erk1/2 sowohl in naiven als auch in chronisch Morphin-behandelten Zellen ist. Der ErbB2 dagegen trägt nur in chronisch Morphin-behandelten Zellen nach Stimulation durch Heregulin- β 1 zur Aktivierung der Erk1/2 bei. Die Pi3K und die Matrix-Metalloproteinasen sind ausschließlich an der Aktivierung der Erk1/2 in chronisch Morphin-behandelten

Zellen, insbesondere nach Stimulation durch Heregulin- β 1 beteiligt.

6.2 Untersuchung des Mechanismus der Akt-Aktivierung

Wie für die Erk1/2, wurde auch der durch μ -Opioid-Rezeptoren vermittelte Mechanismus der Akt-Aktivierung unter Anwendung verschiedener Proteininhibitoren im Western Blot untersucht. In BT474 Zellen ohne Vorbehandlung (naiv) und nach chronischer Opioid-Behandlung (5 Tage, 10 μ M Morphin) wurde die Akt-Phosphorylierung nach 5-minütiger Stimulation durch Heregulin- β 1 bestimmt, nachdem verschiedene Komponenten der Signalkaskade durch Proteininhibitoren inaktiviert wurden.

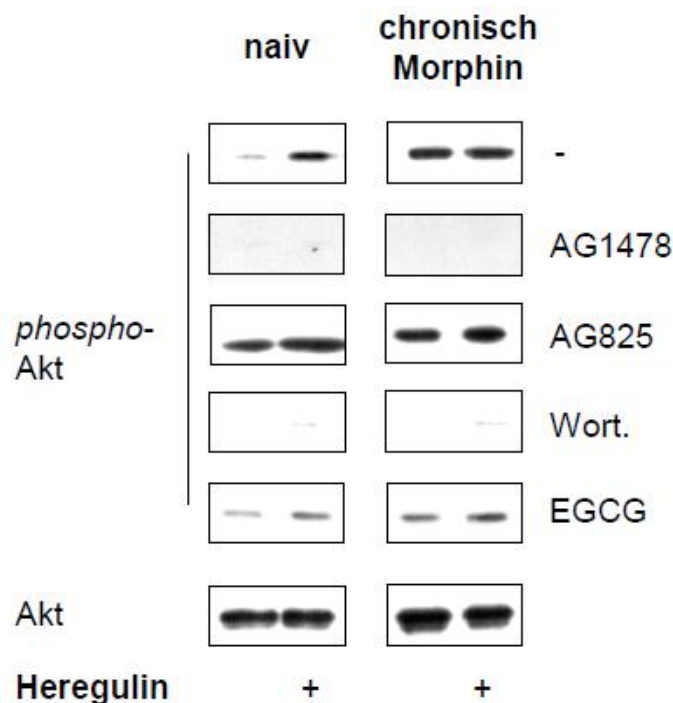


Abb. 16 Veränderungen in der Opioid-vermittelten Akt-Phosphorylierung nach Vorinkubation mit verschiedenen Proteininhibitoren.

Repräsentative Western Blots der Akt-Phosphorylierung nach Inkubation mit verschiedenen Proteininhibitoren. Naive (links) und chronisch Morphin-behandelte (rechts) BT474 Zellen wurden mit folgenden Inhibitoren vorinkubiert (von oben nach unten): Kontrolle ohne Inhibitor; AG1478 (ErbB1 Inhibitor); AG 825 (ErbB2 Inhibitor); Wortmannin (PI3K Inhibitor), EGCG (Inhibitor der Matrix-Metalloproteinasen); Gesamtmenge an Akt.

Die Behandlung der Zellen mit dem ErbB1 Inhibitor AG1478 führt wie bei der Regulation der Erk1/2 auch zu einer vollständigen Hemmung der basalen und

durch Heregulin- β 1 stimulierten Akt-Aktivierung. Die Inhibition des ErbB2 mit AG825 nimmt keinen Einfluss auf die Phosphorylierung der Akt. Durch Inhibition der Pi3K mit Wortmannin wird die Aktivierung der Akt dagegen vollständig unterbunden. Die Hemmung der Matrix-Metalloproteinasen durch EGCG führt in naiven Zellen zu einer geringfügigen Abnahme der durch Heregulin- β 1 stimulierten Akt-Aktivierung. In chronisch Morphin-behandelten Zellen dagegen führt die Vorinkubation mit EGCG zu einer deutlichen Reduktion sowohl der basalen als auch der durch Heregulin- β 1 stimulierten Akt-Phosphorylierung (Abb.16).

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass in naiven und chronisch Morphin-behandelten BT474 Zellen die basale und die durch Heregulin- β 1 stimulierte Aktivierung der Akt sowohl den ErbB1 als auch die Pi3K einschließt. Im Gegensatz zur Aktivierung der Erk1/2 ist der ErbB2 nicht an der Aktivierung der Akt beteiligt. Die Matrix-Metalloproteinasen spielen für die Aktivierung der Akt vor allem in chronisch Morphin-behandelten Zellen eine bedeutende Rolle.

7. Rolle des ErbB1 Rezeptors in der Erk1/2- und Akt-Aktivierung

Nachdem eine essentielle Beteiligung des ErbB1 an der basalen und durch Heregulin- β 1 stimulierten Erk1/2- und Akt-Aktivierung gezeigt wurde, sollte die Rolle des ErbB1 nach direkter Aktivierung mit EGF im Western Blot bestätigt werden. Durch Inhibition des ErbB2 (AG825) wurde festgestellt, ob der ErbB2 an der über ErbB1 vermittelten Erk1/2-Aktivierung nach chronischer Morphin-Behandlung beteiligt ist.

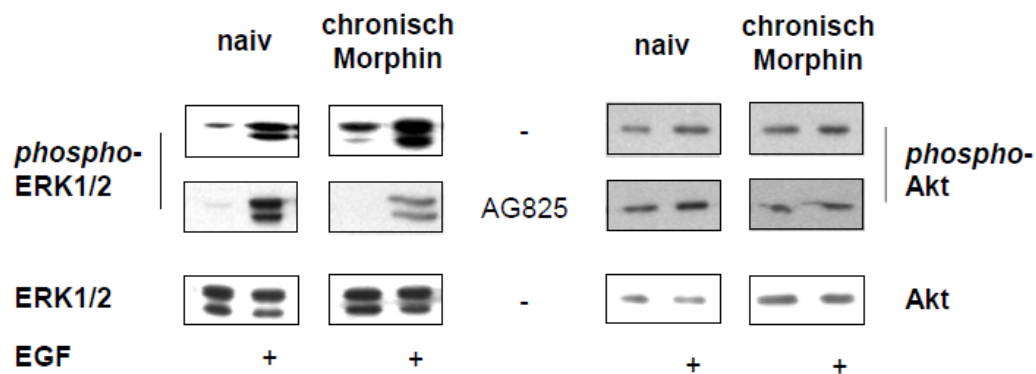


Abb. 17 Erk1/2- und Akt-Aktivierung nach Stimulation mit dem ErbB1 Liganden EGF.

Abgebildet sind repräsentative Western Blots.

Linke Seite, oben: Phospho-Erk1/2 in naiven und chronisch Morphin-behandelten BT474 Zellen mit und ohne Inhibition des ErbB2 durch AG825, je mit und ohne Stimulation durch den ErbB1 Liganden EGF; unten: Gesamtmenge aufgetragener Erk1/2.

Rechte Seite, oben: Phospho-Akt in naiven und chronisch Morphin-behandelten BT474 Zellen mit und ohne Inhibition des ErbB2 Rezeptors durch AG825, je mit und ohne Stimulation durch den ErbB1 Liganden EGF; unten: Gesamtmenge der aufgetragenen Akt.

Die Regulation der Erk1/2 nach Stimulation mit EGF entspricht derjenigen nach Stimulation durch Heregulin- β 1. Bei gleichzeitiger Inhibition des ErbB2 durch AG825 wird die basale Erk1/2-Aktivierung ausschließlich in chronisch Morphin-behandelten Zellen reduziert. Der ErbB2 ist daher nur in chronisch Morphin-behandelten Zellen an der EGF-stimulierten Erk1/2-Phosphorylierung beteiligt.

Die EGF-stimulierte Akt-Phosphorylierung in naiven und chronisch Morphin-behandelten Zellen entspricht derjenigen nach Stimulation durch Heregulin- β 1. Auch hier ist nach Inhibition des ErbB2 durch AG825 keine Beeinflussung der Akt-Aktivierung festzustellen (Abb.17).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Stimulation der mitogenen Signalwege in BT474 Zellen über den ErbB1 vermittelt wird, unabhängig von einer initialen Aktivierung des ErbB1 mit EGF oder der Aktivierung des ErbB3 mit Heregulin- β 1. Der ErbB2 ist an der durch ErbB1 induzierten Erk1/2-Aktivierung nur in chronisch Morphin-behandelten Zellen beteiligt.

8. Veränderungen in der relativen ErbB Rezeptor-Menge und der Bildung von Rezeptor-Heterodimeren nach chronischer Morphin-Behandlung

Um die Ursache für die beobachteten Unterschiede in der Erk1/2- und Akt-Aktivierung zwischen naiven und chronisch Morphin-behandelten BT474 Zellen näher zu bestimmen, wurden mögliche Veränderungen auf Ebene der ErbB Rezeptoren untersucht. Da die Zusammensetzung von Rezeptor-Dimeren großen Einfluss auf die Aktivierung nachgeschalteter Signalwege und auf die Signalintensität besitzt, sollten zunächst die durch eine chronische Morphin-Behandlung induzierten Veränderungen in der Menge der ErbB Rezeptoren in der Zellmembran der BT474 Zellen bestimmt werden. Anschließend wurde mittels Co-Immunpräzipitation untersucht, ob in naiven und chronisch Morphin-behandelten Zellen vergleichbare Dimere für die Signaltransduktion verantwortlich sind.

8.1 Bestimmung der relativen der ErbB Rezeptor-Menge nach chronischer Morphin-Behandlung

Mittels Westen Blot mit Typ-spezifischen Antikörpern wurde die ErbB Rezeptor-Menge in den Zellmembranen der BT474 mit und ohne chronische Morphin-Behandlung evaluiert. Pro Geltasche wurden 20 µg Membranprotein eingesetzt. β -Tubulin wurde als Kontrolle für die gleichmäßige Ladung der Proben auf das Gel benutzt.

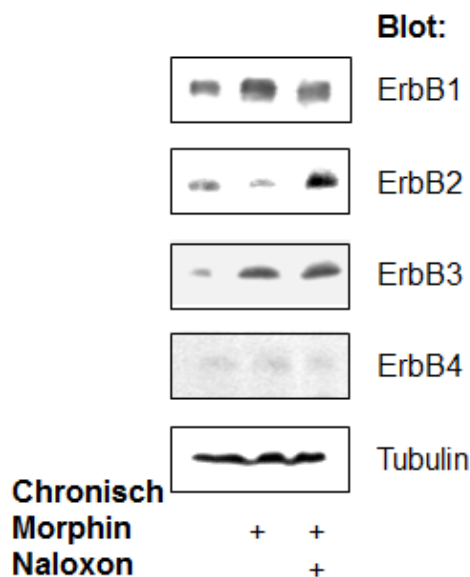


Abb. 18 Veränderung in der ErbB Rezeptor-Menge nach chronischer Morphin-Behandlung.

Repräsentativer Western Blot der ErbB Rezeptor-Menge in BT474 Zellen ohne (naiv) und nach chronischer Morphin-Behandlung. Von oben nach unten: ErbB1, ErbB2, ErbB3, ErbB4, β -Tubulin; jeweils (von links nach rechts) Kontrolle ohne Behandlung, nach chronischer Morphin-Behandlung (10 µM) und nach gleichzeitiger Behandlung mit Morphin und Naloxon (100 µM) für 5 Tage.

Abbildung 18 zeigt, dass die chronische Morphin-Behandlung zu einer Zunahme der relativen Menge an ErbB1 und ErbB3 führt, die ErbB2 Rezeptor-Dichte dagegen nimmt ab. Der ErbB4 ist nur in geringen Mengen in der Zellmembran vorhanden und scheint durch eine chronische Morphin-Behandlung nicht beeinflusst zu werden. Die durch Morphin-Behandlung initiierten Veränderungen sind überwiegend reversibel durch Naloxon. Die β -Tubulin-Kontrolle bestätigt die gleichmäßige Beladung des Gels mit Membranprotein.

8.2 Bestimmung der ErbB1-Heterodimere nach Opioid-Behandlung

Die Versuche mit verschiedenen Proteininhibitoren zeigen eine generelle Beteiligung des ErbB1 an der mitogenen Signaltransduktion. Aus diesem Grund wurde mittels Co-Immunpräzipitation bestimmt, welche Rezeptor-Heterodimere der ErbB1 in naiven und chronisch Morphin-behandelten Zellen mit und ohne Stimulation durch Heregulin- β 1 eingeht. Die Bestimmung der Dimere erfolgte im Western Blot mit Typ-spezifischen Antikörpern. Die Detektion des F_c -Stücks des für die Co-Immunpräzipitation eingesetzten Antikörpers verifizierte die Verwendung gleichmäßiger Antikörperkonzentrationen in den verschiedenen Ansätzen.

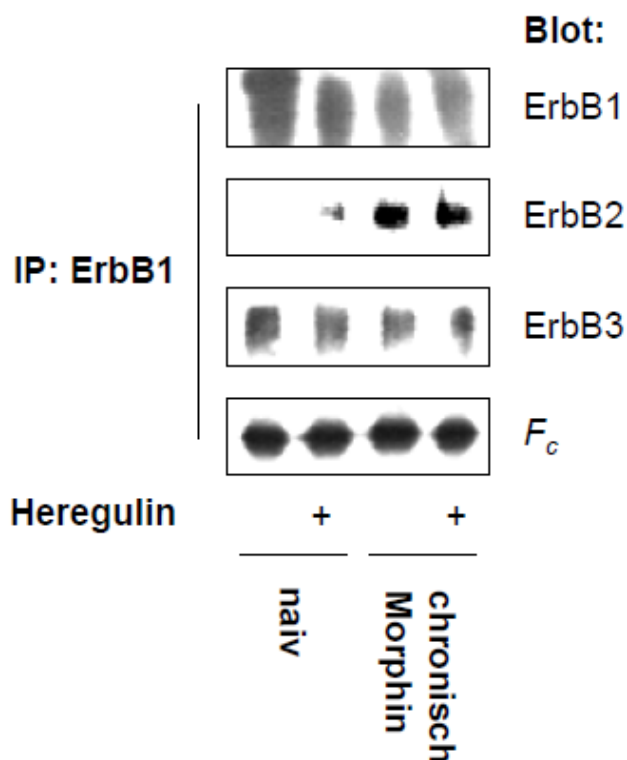


Abb. 19 Modulation der Heterodimere mit ErbB1-Beteiligung nach chronischer Opioid-Behandlung.

Repräsentativer Western Blot der über ErbB1 co-präzipitierten ErbB Rezeptoren. Von oben nach unten: (Dimere bestehend aus ErbB1+) ErbB1, ErbB2, ErbB3 in naiven und chronisch Morphin-behandelten Zellen mit und ohne Stimulation durch Heregulin- β 1.

Eine Präzipitation in etwa gleichbleibender Mengen an ErbB1 weist auf eine erfolgreiche Immunpräzipitation hin. Der ErbB3 liegt unter allen Versuchsbedingungen in Heterodimeren mit ErbB1 vor. Der ErbB2 bildet vor allem nach chronischer Morphin-Behandlung Heterodimeren mit ErbB1 (Abb.19).

VI DISKUSSION

Trotz vermehrter Hinweise auf eine mögliche Beeinflussung verschiedener Aspekte des Tumorwachstums durch Opioide [11], sind die zu Grunde liegenden Mechanismen noch weitestgehend unbekannt. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass BT474 humane Mammakarzinomzellen mit voll funktionsfähigen endogenen μ -Opioid-Rezeptoren ausgestattet sind. Eine chronische Morphin-Behandlung führt in diesen Zellen zu einer Hemmung des ErbB Rezeptor-abhängigen Zellwachstums durch grundlegende Veränderungen in der Rezeptor-Dichte und Heterodimerisierung. Diese Daten zeigen, dass Opioide nicht nur direkt oder indirekt durch Transaktivierung der ErbB Rezeptoren in mitogene Signalkaskaden eingreifen, sondern darüber hinaus qualitative und quantitative Veränderungen auf Ebene der ErbB Rezeptoren hervorrufen können. Die Regulation der ErbB Rezeptoren durch Morphin könnte einen neuen Ansatzpunkt bieten, um die Sensitivität von Tumorzellen gegenüber zielgerichteten Therapiestrategien zu modulieren.

1. BT474 als Zellmodell für μ -Opioid-Rezeptor vermittelte Effekte

Die BT474 Zellen zeichnen sich durch die Ausstattung mit endogenen μ -Opioid-Rezeptoren aus, die auch nach chronischer Exposition gegenüber Morphin voll funktionsfähig bleiben. Dies ist besonders von Interesse, da BT474 Zellen ein wichtiges Modell für die Entwicklung zielgerichteter Therapiestrategien für ErbB2-überexprimierende Mammatumoren darstellen [75] und zur Behandlung von Tumorschmerzen häufig Opioide eingesetzt werden [79, 80], insbesondere Agonisten des μ -Opioid-Rezeptors [9]. Allerdings zeichnet sich das hier verwendete Morphin durch einige Besonderheiten in Bezug auf die Agonist-vermittelte Rezeptor-Internalisierung aus, da Morphin die Regulation des μ -Opioid-Rezeptors umgeht [31]. Andere Agonisten des μ -Opioid-Rezeptors, wie Fentanyl induzieren dagegen eine schnelle Desensibilisierung und könnten dadurch abweichende Effekte auf das Zellwachstum zeigen [23]. Aus diesem Grund sind die durch Morphin-Behandlung erzielten Ergebnisse nicht auf alle Agonisten des μ -Opioid-Rezeptors übertragbar und es wäre unter Umständen sinnvoll, ähnliche Versuche auch mit anderen Agonisten des μ -Opioid-Rezeptors

durchzuführen [81].

2. Einfluss von Morphin auf das Wachstum von BT474 Zellen

Das wichtigste Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist die Hemmung des Wachstums der BT474 Mammakarzinomzellen durch Morphin. Daraus ergibt sich die potentielle Möglichkeit für therapeutisch eingesetzte Opioide mit antineoplastischen Behandlungsstrategien zu interferieren. Die genaue Kenntnis der Regulation des Zellzyklus, insbesondere des Wachstumsverhaltens eines Tumors, bildet die Grundlage für die zielgerichtete Behandlung von Tumoren mit Abweichungen im ErbB Rezeptor-vermittelten Zellwachstum [82, 83].

Besonderes Augenmerk verdient die Tatsache, dass die Wachstumshemmung von BT474 Zellen durch Morphin am deutlichsten bei gleichzeitiger Stimulation mit dem Wachstumsfaktor Heregulin- β 1 ausgeprägt ist. Im Zellverband sind verschiedenste Wachstumsfaktoren zugegen [53], die für die physiologische Funktion und Entwicklung der Zellen verantwortlich sind. So ist am Beispiel des ErbB1 ein paralleles Auftreten verschiedener Liganden durch auto-, para- und juxtakrine Freisetzung, auch in gesunden Geweben während der Lungenentwicklung, beschrieben [84]. ErbB Rezeptor-abhängige Tumorzellen unterscheiden sich von gesunden Zellen durch die Dominanz spezifischer autokrin produzierter Liganden [50, 85]. Hinweise auf eine parallele Hochregulation ergeben sich auch aus der Korrelation der Überexpression bestimmter ErbB Rezeptoren mit einer Überexpression ihrer aktivierenden Liganden in verschiedenen Gewebeproben aus Tumoren der Brust [86]. In verschiedenen Melanom-Zelllinien konnte darüber hinaus die korrespondierende Überexpression der ErbB1 Liganden mit einer Aktivitätserhöhung verschiedener Matrix-Metalloproteinasen korreliert werden [53].

In den letzten Jahren wurden zunehmend Studien zur Wachstumsbeeinflussung verschiedener Zellsysteme durch Morphin publiziert [11, 87]. Die Ergebnisse dieser Studien sind allerdings sehr variabel und reichen von proliferativen oder anti-apoptotischen Effekten [88-91] bis hin zu pro-apoptotischen oder anti-proliferativen Einflüssen [92-96]. Mögliche Ursachen für diese unterschiedlichen Resultate können in der Durchführung der Studien als in vitro und in vivo Experimente sowie in der Verwendung verschiedener Zellsysteme begründet sein.

Gerade die zellspezifische Ausstattung mit Rezeptoren und intrazellulären Effektorwegen beeinflusst in hohem Maße die Art der Zellreaktion auf eingehende Signale [87]. Zudem wurden in den verschiedenen Studien zur Wachstumsbeeinflussung von Tumoren durch Morphin unterschiedliche Morphin-Konzentrationen und verschiedene Behandlungsprotokolle verwendet, wodurch die Vergleichbarkeit dieser Ergebnisse erschwert wird [87]. Die Aussagefähigkeit dieser Studien wird zudem dadurch weiter eingeschränkt, dass in den wenigsten Fällen die durch Morphin-Behandlung beobachteten Effekte eindeutig auf durch Opioid-Rezeptoren vermittelte Mechanismen zurückgeführt werden konnten [93]. Aus diesem Grund wurde für die vorliegende Arbeit ein Tumorzellsystem ausgewählt, das voll funktionsfähige endogene Opioid-Rezeptoren besitzt. Die eindeutige Vermittlung der Wachstums-beeinflussenden Effekte über μ -Opioid-Rezeptoren in BT474 Zellen nach Morphin-Behandlung wurde in den Versuchen durch die Aufhebbarkeit mit Naloxon bestätigt.

3. Regulation der BT474 Zellproliferation und Apoptose durch Morphin

Die Hemmung des Zellwachstums durch Morphin kann generell durch Änderungen in der Zellproliferation und/oder der Apoptose vermittelt werden. Die Regulation der Proliferation durch Opioide schließt die Aktivierung der Erk1/2-Signalkaskade ein. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine akute Aktivierung von μ -Opioid-Rezeptoren durch Morphin in den Erk1/2-Signalweg eingreift. Die Ergebnisse waren jedoch auf den ersten Blick widersprüchlich. So stimulierte Morphin in naiven Zellen die basale Erk1/2-Phosphorylierung, während die durch Heregulin- β 1 stimulierte Aktivität gehemmt wurde. Nach chronischer Morphin-Behandlung stieg die basale sowie die durch Heregulin- β 1 stimulierte Erk1/2-Phosphorylierung an. Morphin steigerte demnach im Gegensatz zu naiven Zellen die durch Heregulin- β 1 stimulierte Aktivierung der Erk1/2 in chronisch Morphin-behandelten Zellen. Grundsätzlich können Opioide die Erk1/2 direkt über Aktivierung der Pi3K, der PLC, der Src und durch die $\beta\gamma$ -Untereinheit der G-Proteine [97] oder indirekt über Transregulation von RTKs aktivieren [11]. Die Unterschiede in der basalen und der durch Heregulin- β 1 stimulierten Erk1/2-Aktivität zwischen naiven und chronisch Morphin-behandelten Zellen weisen jedoch auf eine durch μ -Opioid-

Rezeptoren vermittelte Beeinflussung der ErbB Signalgebung hin.

Die Regulation der Zellproliferation durch Opioide steht im Einklang mit der Aktivierung der Erk1/2, da in chronisch Morphin-behandelten Zellen die durch Heregulin- β 1 stimulierte Proliferation gesteigert wird, während sie in naiven Zellen gehemmt wird. Das führt zu dem Schluss, dass die akute Stimulation der BT474 Zellen mit Opioiden über die Erk1/2 in die Zellproliferation eingreift. Die Art der Regulation verändert sich jedoch nach chronischer Morphin-Behandlung, was auf grundsätzliche Veränderungen im ErbB Rezeptor-abhängigen Wachstum der BT474 Zellen hinweist. Die durch akute Morphin-Stimulation induzierte Erk1/2-Phosphorylierung in unbehandelten Zellen mündet in einer gesteigerten Zellproliferation. Die Abschwächung dieses Effekts durch gleichzeitige Stimulation mit Heregulin- β 1 ist auf eine vornehmlich anti-apoptotische Signalgebung in unbehandelten Zellen durch Heregulin- β 1 zurückzuführen. Die dagegen additiv proliferationssteigernden Effekte von Opioiden in chronisch Morphin-behandelten Zellen sind ein Indiz für die Verlagerung von einem anti-apoptotischen hin zu einem proliferativen Zellwachstum.

Die Steigerung der durch Heregulin- β 1 stimulierten Erk1/2-Phosphorylierung und der Proliferationsrate in BT474 Zellen durch Morphin steht zunächst im Widerspruch zur Hemmung des Zellwachstums. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass Opioide neben mitogenen auch Apoptose-induzierende Signalwege regulieren können. In der Literatur wurden für Morphin bisher verschiedene Apoptose-auslösende Mechanismen in unterschiedlichen Zellmodellen beschrieben. Unter anderem die vermehrte Expression des Apoptose-fördernden Proteins Bim, die Reduktion des anti-apoptotisch wirkenden Proteins Bcl-2 [87] sowie die Stabilisierung von p53 [98]. Gleichzeitig werden für Morphin jedoch auch anti-apoptotische Mechanismen in verschiedenen Zellmodellen beschrieben, die auf einer Aktivierung des Akt-Signalweges beruhen [99]. In der vorliegenden Arbeit wurde eine paradoxe Hochregulation der Akt-Aktivität durch die chronische Morphin-Behandlung trotz gleichzeitiger Hemmung des Zellwachstums festgestellt. Eine mögliche Ursache für die Wachstumshemmung bei gleichzeitiger Steigerung der Zellproliferation könnte die Induktion zusätzlicher Apoptose-fördernder Signalwege durch die chronische Morphin-Behandlung sein. Eine gegenteilige Regulation von Erk1/2 und Akt wurde kürzlich in Tumorzellen mit Pi3K-abhängigem Wachstum beschrieben, in denen

eine negative Rückkopplung die Erk1/2-Aktivierung zu Gunsten Akt-vermittelter Survival-Effekte vermindert [100]. Eine Hochregulation der Akt-Aktivität durch Morphin könnte auch über eine Phosphorylierung der Pi3K durch $\beta\gamma$ -Untereinheiten vermittelt werden [97].

Die Hochregulation der Akt nach chronischer Morphin-Behandlung kann zudem mit einer Veränderung des Signalcharakters einhergehen. Neben anti-apoptotischen Survival-Signalen kann Akt auch über die Regulation der Glykogen Kinase-3, der Phosphodiesterase-3B, von mTOR (mammalian Target of Rapamycin) und von Raf in die Proteinsynthese, das Zellwachstum und die Zellproliferation eingreifen [56]. Eine vergleichbare Hyperaktivierung der Akt ist in verschiedenen Tumorarten beschrieben und hat ihre Ursache bei Tumoren der Brust häufig in einer Herabregulation des Tumorsuppressors PTEN, der unter anderem auch die Akt-Signaltransduktion terminiert [2]. Die Hochregulation der Akt-Phosphorylierung in BT474 Zellen kann demnach zur vermehrten Proliferation beitragen und durch Wegfall der Survival-Signale gleichzeitig Apoptose ermöglichen.

Nachdem ausgeschlossen werden konnte, dass die Wachstumshemmung der BT474 Zellen durch Morphin auf einer direkten Hemmung proliferativer oder anti-apoptotischer Signale beruht, konnte eine gesteigerte Apoptose als Ursache für das verminderte Zellwachstum identifiziert werden. Die Apoptose war bei gleichzeitiger Stimulation durch Heregulin- β 1 besonders stark ausgeprägt.

4. Morphologische Veränderungen der BT474 Zellen durch Behandlung mit Morphin und Heregulin- β 1

Bemerkenswert sind auch die durch chronische Behandlung mit Morphin und Heregulin- β 1 ausgelösten morphologischen Veränderungen der BT474 Zellen. Die Abrundung der Zellen nach Morphin-Behandlung oder nach gleichzeitiger Behandlung mit Morphin und Heregulin- β 1 kann durch das vermehrte Eintreten der Zellen in die Apoptose erklärt werden [101]. Diese Annahme wird durch die vermehrte Bindung von Annexin V an die Zellmembran belegt. Die Reversibilität der Opioid-induzierten morphologischen Veränderungen, bei gleichzeitiger Anwesenheit des Antagonisten Naloxon, verdeutlicht einen durch μ -Opioid-Rezeptoren vermittelten Effekt [9].

Nach Behandlung mit Heregulin- β 1 zeichnen sich die Zellen durch Differenzierungseigenschaften, wie polygonale Zellkörperform, geringes Kernvolumen im Vergleich zum Zytoplasma und Bildung von Zellausläufern aus [102]. Vergleichbare morphologische Veränderungen, unter anderem die Ausbildung von Zellausläufern, wurden in verschiedenen Tumorzellen einschließlich Brustkrebszelllinien nach Exposition gegenüber Heregulin- β 1 bereits beschrieben [103, 104]. Diese Differenzierung durch Heregulin- β 1 konnte mit aggressiveren Tumoreigenschaften wie erhöhter Migrationsfähigkeit und Metastasierungsbereitschaft sowie gesteigerter Invasivität der Tumorzellen in Verbindung gebracht werden [104]. Die Interaktion von Morphin mit der durch Heregulin- β 1 induzierten Zelldifferenzierung könnte einen therapeutischen Ansatzpunkt für die Hemmung aggressiver Tumoreigenschaften bieten.

5. Interaktion von Morphin mit dem ErbB Rezeptor-Netzwerk

Die ErbB Rezeptoren integrieren in gesunden Zellen eine Vielzahl auto- und parakriner extrazellulärer Signale und transferieren diese in die Zelle, die sich so an die Wachstumsbedingungen ihrer Umgebung adaptieren kann [4]. Viele Tumoren nutzen eine Hyperaktivierung des ErbB Netzwerks für die schnelle klonale Expansion [50].

Die am besten erforschte Abweichung im ErbB Rezeptor-System ist die Überexpression des ErbB2, die für unterschiedliche Tumorarten [105], darunter auch verschiedene Formen des Brustkrebs, beschrieben ist [51]. Der Überexpression liegt in den meisten Fällen eine Genamplifikation zu Grunde [74]. Da 25-30% aller Mammatumoren eine Überexpression des ErbB2 aufweisen [75], ist dieser Rezeptor eines der Hauptziele für die Entwicklung zielgerichteter Tumor-Therapiestrategien [73]. Derzeit sind verschiedene spezifisch gegen den ErbB2 gerichtete Medikamente mit großem Erfolg im Einsatz [55]. Ein großer Nachteil ist jedoch, dass Tumorzellen unter Therapie schnell verschiedene Resistenzmechanismen durch Aktivierung redundanter Signalwege entwickeln können [73].

Als Ursache für die Hemmung des Zellwachstums der BT474 Zellen durch chronische Morphin-Behandlung konnten quantitative und qualitative Veränderungen im ErbB Netzwerk identifiziert werden. Die chronische Morphin-

Behandlung führt zu einer Reaktivierung des ErbB2 und zu einer Verschiebung der durch Heregulin- β 1 stimulierten Zellproliferation von einem ErbB1/ErbB3-hin zu einem ErbB1/ErbB2-abhängigen Mechanismus. Bemerkenswert ist, dass der ErbB1 unter allen Versuchsbedingungen sowohl hinsichtlich der Akt- als auch der Erk1/2-Aktivierung essentiell ist, wohingegen der ErbB2 trotz Überexpression nur in chronisch Morphin-behandelten Zellen die Phosphorylierung der Erk1/2 vermittelt. Verständlich wird die Bevorzugung des Erk1/2-Signalwegs durch ErbB2-enhaltende Dimere auf Grund der Eigenschaft des ErbB2, den Ras/Raf/Erk1/2-Signalweg direkt über verschiedene Adapterproteine zu induzieren. Die Pi3K und somit Akt kann über ErbB2 dagegen nur indirekt aktiviert werden [105, 106]. Eine Reaktivierung des ErbB2 erklärt auch die verstärkte Erk1/2-Phosphorylierung nach chronischer Morphin-Behandlung, da ErbB2-enhaltende Heterodimere eine höhere Signalaktivität vermitteln als ErbB1/ErbB3 Dimere [53].

Um die ErbB3-vermittelte Signaltransduktion nach chronischer Morphin-Behandlung zu untersuchen, wurde die Erk1/2- und Akt-Phosphorylierung nach Stimulation durch den ErbB3 Liganden Heregulin- β 1 bestimmt. In naiven BT474 Zellen stimuliert Heregulin- β 1 sowohl den Erk1/2- als auch den Akt-Signalweg über ErbB1/ErbB3 Dimere. Die Induktion der Erk1/2-Phosphorylierung durch Heregulin- β 1 beruht in unbehandelten BT474 Zellen auf einer ErbB3-vermittelten Aktivierung und anschließender Dimerisierung [52]. Eine vergleichbare Erk1/2-Aktivierung durch ErbB3-induzierte Transphosphorylierung des ErbB1 in ErbB1/ErbB3 Dimeren wurde bereits in anderen Studien beschrieben und schließt die Bindung der Adapterproteine Shc und Grb2 ein [105, 107]. Trotz der defekten Kinase-Aktivität kann der ErbB3 in Heterodimeren durch Transphosphorylierung und direkte Bindung an die regulatorischen Untereinheiten der Pi3K eine sehr effektive Akt-Aktivierung induzieren [50, 105]. Darüber hinaus können ErbB1/ErbB3 Heterodimere die Akt auch indirekt über eine ErbB1/Grb2/Gab-vermittelte Cross-Regulation der Pi3K aktivieren [108]. Unabhängig vom Regulationsmechanismus vermitteln die ErbB1/ErbB3 Dimere eine effiziente Pi3K-vermittelte Akt-Signaltransduktion [105]. In unbehandelten BT474 Zellen liegt der Fokus der mitogenen Signaltransduktion somit vermutlich auf einer Akt-vermittelten Generierung von Survival-Signalen.

In chronisch Morphin-behandelten Zellen wird die durch Heregulin- β 1 vermittelte

Erk1/2-Aktivierung von ErbB1/ErbB2 Dimeren übernommen. Die durch Heregulin- β 1 stimulierte Erk1/2-Phosphorylierung ist in chronisch Morphin-behandelten Zellen von der Funktion membrangebundener MMPs abhängig und impliziert die Freisetzung eines endogenen Liganden durch „ectodomain shedding“, der wiederum ErbB1/ErbB2 Dimere aktivieren kann. Eine vergleichbare Reaktivierung des ErbB2 in Brustkrebszellen wurde nach chronischer Behandlung mit Herceptin® über eine ADAM17-vermittelte und Akt-abhängige Freisetzung alternativer Liganden und Aktivierung redundanter Signalwege beschrieben [109].

Die Abhängigkeit der durch Heregulin- β 1 vermittelten ErbB1/ErbB2 Aktivität von der Pi3K konnte nur nach chronischer Morphin-Exposition, nicht aber in naiven Zellen festgestellt werden. Eine Pi3K-vermittelte Cross-Aktivierung des Erk1/2- Signalweges wurde bisher nur selten nachgewiesen, ein Zusammenhang zur jeweils verwendeten Zellart und die zu Grunde liegenden Mechanismen blieben ungeklärt. Vorgeschlagen wurde ein Mechanismus, bei dem ErbB1 in Anwesenheit geringer Konzentrationen von EGF-like Liganden die Adapterproteine Grb2 und Shc an die Zellmembran rekrutiert [110]. Obwohl eine vergleichbare Cross-Aktivierung der Erk1/2 durch Pi3K nicht restlos ausgeschlossen werden kann, weist die gleichzeitige Abhängigkeit der ErbB1/ErbB2-vermittelten Erk1/2-Aktivierung von MMPs auf eine Pi3K-abhängige Freisetzung EGF-ähnlicher Liganden durch „ectodomain shedding“ hin. Ein derartiger Mechanismus wird unterstützt durch die Tatsache, dass die Pi3K in Tumorzellen mit ErbB3-abhängigem Wachstum in der Lage ist, durch negative Rückkopplung eine kompensatorische Erk1/2-Aktivierung zu induzieren [100].

Die durch Heregulin- β 1 vermittelte Aktivierung der Akt wird sowohl in naiven als auch in chronisch Morphin-behandelten Zellen über Pi3K vermittelt. Dennoch bleibt die Frage, in welcher Weise Heregulin- β 1 eine Aktivierung der Akt in chronisch Morphin-behandelten Zellen ermöglicht. Es kann nicht geklärt werden, ob die Pi3K direkt über den μ -Opioid-Rezeptor oder indirekt über RTKs aktiviert wird und ob sich naive von chronisch Morphin-behandelten Zellen in diesem Punkt unterscheiden. Da der ErbB2 weder in naiven noch in chronisch Morphin-behandelten Zellen an der Aktivierung der Akt beteiligt ist liegt nahe, dass die Akt-Aktivierung in beiden Fällen durch ErbB1/ErbB3 Dimere über die direkte

Bindung des ErbB3 an die Pi3K induziert wird [105].

Die Abhängigkeit der ErbB1/ErbB3-vermittelten Akt-Aktivierung in chronisch Morphin-behandelten Zellen von MMPs widerspricht nicht der Freisetzung eines ErbB1-bindenden Liganden durch „ectodomain shedding“ als Ursache der ErbB1/ErbB2-Aktivierung. Ein solcher EGF-like Ligand würde zusätzlich zu ErbB1/ErbB2 auch ErbB1/ErbB3 Dimere aktivieren. Eine Induktion nicht nur von ErbB1/ErbB2, sondern auch von ErbB1/ErbB3 Dimeren ist für den ErbB1 Liganden EGF bereits beschrieben [111, 112], der ErbB2 wird jedoch als Dimerisierungspartner nach EGF-Stimulation bevorzugt [112]. Durch ErbB1 Liganden aktivierte ErbB1/ErbB3 Dimere stellen die Minderheit dar. Dies erklärt auch den weitaus größeren Einfluss funktioneller MMPs auf die Erk1/2-Phosphorylierung als auf die Aktivierung der Akt. Der Übergang der mitogenen Signaltransduktion in chronisch Morphin-behandelten Zellen von einem ErbB1/ErbB3- zu einem ErbB1/ErbB2-abhängigen Mechanismus konnte durch direkte Stimulation der BT474 Zellen mit dem ErbB1 Liganden EGF bestätigt werden. In unbehandelten Zellen können sowohl EGF als auch Heregulin- β 1 ErbB1/ErbB3 Dimere aktivieren. In chronisch Morphin-behandelten Zellen kann die im Überschuss gewählte EGF-Konzentration sowohl ErbB1/ErbB3 als auch ErbB1/ErbB2 Dimere durch Aktivierung des ErbB1 induzieren und dadurch die Erk1/2-Aktivierung und die Akt-Aktivierung aufrecht erhalten [111].

Um die Morphin-induzierten Veränderungen im ErbB Netzwerk genauer zu definieren, wurden die relativen Mengen der einzelnen ErbB Rezeptor-Typen in der Zellmembran von BT474 Zellen bestimmt. In der Tat liegen ErbB1 und ErbB3 nach chronischer Morphin-Behandlung in größerer Menge, ErbB2 dagegen in geringerer Menge vor. Die Zunahme von ErbB1 und ErbB3 kann durch eine über μ -Opioid-Rezeptoren vermittelte Internalisierung der ErbB Rezeptoren erklärt werden. Ein solcher Mechanismus wurde bereits als Ursache für eine persistierende Erk1/2-Aktivierung durch Morphin beschrieben, die über eine Hemmung der ErbB Degradation durch Herabregulation der E3-Ubiquitin-Ligase c-Cbl vermittelt wird [113]. Ob der Rezeptor nach Internalisierung degradiert oder durch Recycling wieder an die Zelloberfläche zurückgeführt wird, ist darüber hinaus von der Art des aktivierenden Liganden abhängig [112]. So wird der ErbB1 nach Aktivierung durch TGF- α vermehrt recycelt, während er nach Aktivierung durch EGF vermehrt degradiert wird [105]. Die Zunahme des ErbB1

in Morphin-behandelten Zellen könnte durch μ -Opioid-Rezeptor induziertes „ectodomain shedding“ und Freisetzung eines autokrin wirkenden Wachstumsfaktors ein effizienteres Recycling des ErbB1 bewirken. Zudem wird der ErbB1 selbst nach Aktivierung durch EGF bei gleichzeitiger Anwesenheit des ErbB2 vermehrt recycelt [105]. Der ErbB3 wird nach Liganden-Aktivierung generell verstärkt recycelt, darüber hinaus begünstigt die Aktivierung mit Neuregulinen wie Heregulin- β 1 im Allgemeinen das Rezeptor-Recycling [105]. Die gegensätzliche Herabregulation von ErbB2 kann ihre Ursache in vermehrter, schneller Internalisierung nach Aktivierung haben, wie sie typisch ist für ErbB2-überexprimierende Zellen [114].

Die Verlagerung der durch Heregulin- β 1 stimulierten Erk1/2-Signalgebung nach chronischer Morphin-Behandlung der BT474 Zellen von einem ErbB1/ErbB3- zu einem ErbB1/ErbB2-vermittelten Mechanismus unterstreicht die hohe Plastizität des ErbB Rezeptor-Netzwerk in Tumorzellen. Eine mögliche Regulation der ErbB-vermittelten Signalgenerierung wurde kürzlich in BT474 und SKBR3 Zellen beschrieben. In diesen Arbeiten wurde nach einer Hemmung des ErbB1 und ErbB2 eine Aufrechterhaltung des Wachstums durch Reaktivierung der verbleibenden ErbB3 und ErbB4 festgestellt [115]. Damit einher ging eine Verlagerung des vornehmlich Erk1/2-kontrollierten Wachstums hin zu einem Akt-abhängigen Mechanismus [116]. Dies illustriert, dass Tumorzellen ihr Wachstumsverhalten sehr schnell auf verschiedene äußere Einflüsse über individuelle Veränderungen im ErbB Netzwerk adaptieren können.

Die durch chronische Morphin-Behandlung ausgelösten quantitativen Veränderungen auf Ebene der ErbB Rezeptoren können auch das Dimerisierungsverhalten beeinflussen [50]. Dies spiegelt sich in BT474 Zellen durch das Auftreten von ErbB1/ErbB2 Dimeren wider. Der Anstieg der basalen Akt- und Erk1/2-Aktivität nach chronischer Morphin-Behandlung könnte zudem durch eine absolute Zunahme Signal-gebender Dimere erklärt werden. Obwohl durch die Co-Immunpräzipitation nur ErbB1-enthaltende Dimere nachgewiesen wurden, kann das Vorliegen von ErbB2/ErbB3 Dimeren durch die essentielle Abhängigkeit der Signaltransduktion vom ErbB1 in naiven und chronisch Morphin-behandelten BT474 Zellen ausgeschlossen werden. Das Vorliegen von ErbB1/ErbB3 Dimeren sowohl in unbehandelten als auch in chronisch Morphin-behandelten Zellen lässt zudem darauf schließen, dass in unbehandelten BT474

Zellen trotz der Überexpression des ErbB2 ein ErbB3-abhängiges Wachstum vorliegt [117].

Der genaue Mechanismus über den Morphin die Beteiligung der einzelnen ErbB Rezeptoren an den Signal-transferierenden Dimeren beeinflusst, muss noch näher untersucht werden. Eine mögliche Erklärung ist eine langanhaltende inhibitorische Signalgebung durch das Ausbleiben einer Rezeptor-Desensitisierung, die typisch für Morphin am μ -Opioid-Rezeptor ist [118]. So können durch Langzeitbehandlung mit Morphin kompensatorische Mechanismen in der Signalweiterleitung induziert werden, wie sie in neuronalen Geweben für die Ausbildung von Toleranz und Abhängigkeit beschrieben sind [29].

6. Schlussfolgerung

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die chronische Morphin-Behandlung in μ -Opioid-Rezeptor tragenden BT474 Zellen zu fundamentalen Veränderungen im ErbB Rezeptor-Netzwerk führt. Die komplexen Veränderungen umfassen die Neuorganisation von Rezeptor-Dimeren und die Etablierung eines autokrinen Feedback Mechanismus, der zu einer Trennung der Aktivierung der Erk1/2- von der Akt-Signalkaskade führt. Aus den gewonnenen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass in naiven Zellen die Aktivierung des Erk1/2- und des Akt-Signalweges durch den ErbB3 Liganden Heregulin- β 1 über ErbB1/ErbB3 Heterodimere induziert wird. Aufgrund der Abhängigkeit der Akt-Phosphorylierung von Pi3K scheint der ErbB3 in diesen Heterodimeren vornehmlich die Aufgabe der Akt-Aktivierung zu übernehmen, während der ErbB1 die Erk1/2-Phosphorylierung vermittelt. In chronisch Morphin-behandelten Zellen bleibt die Akt-Aktivierung weiterhin ErbB1- und Pi3K-abhängig. Da zudem die Stimulation mit Heregulin- β 1 nur über Beteiligung des ErbB3 möglich ist, muss die Akt-Phosphorylierung nach wie vor über ErbB1/ErbB3 Heterodimere vermittelt werden. Darüber hinaus stellt sich eine ErbB2-Abhängigkeit der durch Heregulin- β 1 stimulierten Erk1/2-Aktivität ein. Da ErbB1/ErbB2 Heterodimere jedoch nicht direkt durch Heregulin- β 1 induziert werden können und da die Aktivierung der Erk1/2 in chronisch Morphin-behandelten Zellen abhängig von Pi3K und der Freisetzung von Wachstumsfaktoren durch MMPs ist, kann eine Stimulation der ErbB1/ErbB3 Heterodimere durch Heregulin- β 1 nur über eine autokrine Aktivierung von

ErbB1/ErbB2 Heterodimeren nach Freisetzung eines EGF-ähnlichen Liganden induziert werden. Der vorgeschlagene Regulationsmechanismus wird in Abbildung 20 schematisch dargestellt.

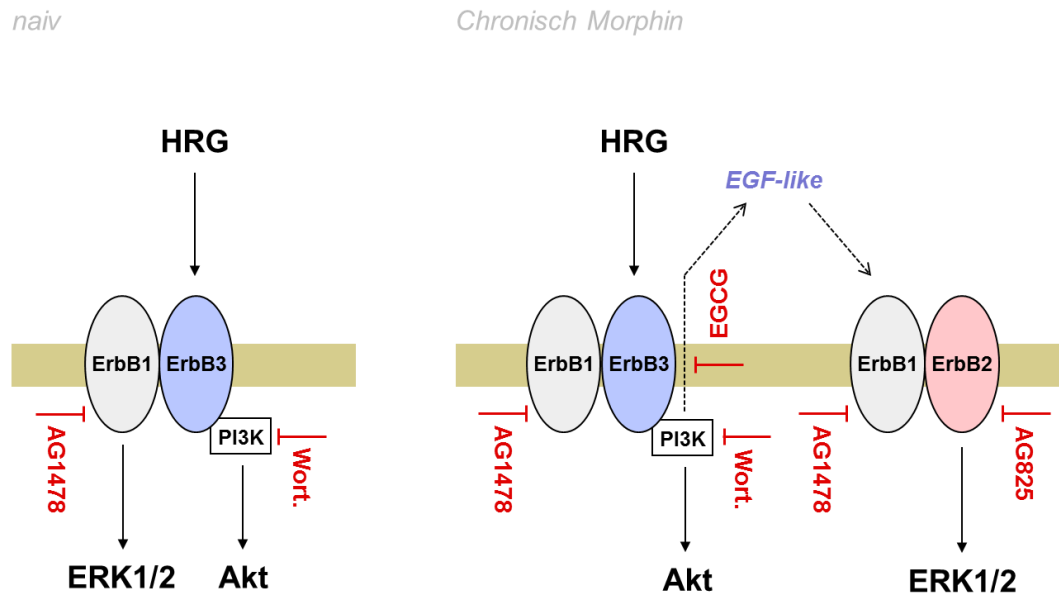


Abb. 20 Schematische Darstellung der vorgeschlagenen, durch chronische Morphin-Behandlung ausgelösten Veränderungen in der ErbB-vermittelten Signaltransduktion nach Stimulation mit Heregulin-β1.

Während in naiven Zellen sowohl die Erk1/2- als auch die Akt-Aktivierung durch ErbB1/ErbB3 Dimere bewerkstelligt wird, findet in chronisch Morphin-behandelten Zellen eine Trennung der beiden Signalwege statt. Heregulin-β1 stimuliert über ErbB1/ErbB3 Dimere direkt nur noch die Akt, während die Erk1/2 durch einen Pi3K abhängigen autokrinen Mechanismus unter Freisetzung eines ErbB1 Liganden von ErbB1/ErbB2 Dimeren übernommen wird. Die angegebenen Inhibitoren verdeutlichen, wie diese Hypothese aus den verschiedenen Versuchen geschlussfolgert werden kann.

Die in der vorliegenden Arbeit aufgeklärte Regulation des ErbB Netzwerks könnte eine Erklärung für die Vielzahl unterschiedlicher Effekte von Morphin auf die Zellproliferation und die Induktion der Apoptose in unterschiedlichen Zellsystemen bieten. Die Beeinflussung des ErbB Netzwerks über eine Aktivierung des μ -Opioid-Rezeptors könnte neue Aspekte für die zielgerichtete Tumorthherapie aufzeigen. Die Stabilisation ErbB2-enthaltender Rezeptor-Dimere könnte zum Einen die Wirksamkeit von gegen ErbB2 gerichteten Pharmaka erhöhen und zum Anderen der Ausbildung von Resistenzmechanismen entgegenwirken.

VII ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wird die Regulation des Wachstums von ErbB2-überexprimierenden BT474 humanen Brustkrebszellen durch Morphin untersucht. Voraussetzung hierfür ist, dass in BT474 Zellen voll funktionsfähige endogene μ -Opioid-Rezeptoren nachgewiesen werden konnten. Die chronische Exposition der BT474 Zellen gegenüber Morphin führt spezifisch über μ -Opioid-Rezeptoren zu einer Hemmung des Zellwachstums, die in Anwesenheit des Wachstumsfaktors Heregulin- β 1 besonders ausgeprägt ist. Die Hemmung des Zellwachstums resultiert aus einer Induktion der Apoptose trotz gleichzeitiger Aktivierung des mitogenen Erk1/2-Signalwegs und der anti-apoptotischen Akt-Signalkaskade durch Morphin. Diese durch μ -Opioid-Rezeptoren vermittelten Veränderungen im Wachstumsverhalten der Zellen basieren auf einer Regulation des ErbB Rezeptor-Netzwerks. Insbesondere führt die chronische Exposition gegenüber Morphin zu einer Dissoziation der Erk1/2- von der Akt-Signalkaskade durch quantitative und qualitative Veränderungen der an den signalgebenden Dimeren beteiligten ErbB Rezeptoren. Während in naiven BT474 Zellen beide Signalwege über ErbB1/ErbB3 Dimere reguliert werden, kommt es nach chronischer Morphin-Behandlung zu einer Reaktivierung des ErbB2. Unter diesen Bedingungen wird die Erk1/2-Aktivierung von ErbB1/ErbB2 Dimeren vermittelt, während ErbB1/ErbB3 Dimere weiterhin den Akt-Signalweg kontrollieren. Die Aktivierung der ErbB1/ErbB2 Dimere in chronisch Morphin-behandelten Zellen nach Stimulation mit dem ErbB3 Liganden Heregulin- β 1 wird durch ein Pi3K- und MMP-abhängiges „ectodomain shedding“ eines ErbB1-aktivierenden Liganden vermittelt. Die Ergebnisse zeigen, dass Opioide nicht nur über Transaktivierung von RTKs mitogene Signalwege beeinflussen, sondern grundsätzlich auch direkt das Wachstumsverhalten von Tumorzellen über komplexe durch μ -Opioid-Rezeptoren vermittelte Veränderung im ErbB Netzwerk regulieren können. Ein derartiges Eingreifen in das Wachstum ErbB-abhängiger Tumorzellen durch Morphin könnte einen neuen Ansatzpunkt für die Steigerung der Wirksamkeit zielgerichteter Therapiestrategien und die Vermeidung von Resistenzentwicklungen darstellen.

VIII SUMMARY

In the present work, the interaction of chronic Morphine treatment with the ErbB receptor signalling network in ErbB2 overexpressing BT474 human breast carcinoma cell line is studied. BT474 cells were shown to present fully functional endogenous μ -opioid receptors at their cell surface providing the ability to integrate external signals in intracellular response, even after chronic Morphine treatment. Despite the induction of mitogenic Akt and Erk1/2 signalling, chronic exposure of BT474 cells to Morphine enhances cell death, especially when these cells are simultaneously stimulated by the growth factor Heregulin- β 1. Furthermore, chronic activation of μ -opioid receptors in BT474 cells triggers complex changes in cell growth by interacting with the mitogenic ErbB receptor network through rearrangement of involved ErbB receptors. Consequently, Erk1/2 becomes separated from Akt signalling. More precise, stimulation with the growth factor Heregulin- β 1 in untreated cells leads to activation of ErbB1/ErbB3 dimers. This induces both Akt and Erk1/2 signalling, despite the overexpression of ErbB2 in this cell line. Chronic morphine treatment switches Erk1/2 activation to ErbB1/ErbB2 dimers, while ErbB1/ErbB3 dimers still promote Akt signalling. The reactivation of ErbB2 involved in dimer formation is based on direct ErbB1 activation in ErbB1/ErbB2 through an EGF-like ligand released by ectodomain shedding of membrane-bound precursors through MMPs. This autocrine feedback loop is dependent to Pi3K activation by ErbB1/ErbB3 dimers which are stimulated by Heregulin- β 1 in cells under chronic Morphine treatment. The complex regulation of mitogenic ErbB signalling network by Morphine in BT474 cells suggest that concomitant morphine treatment might enhance the sensitivity of targeted anti-tumour strategies or could support to avoid the development of resistance mechanisms.

IX LITERATURVERZEICHNIS

1. Hurvitz, S.A., et al., *Current approaches and future directions in the treatment of HER2-positive breast cancer*. Cancer Treatment Reviews, 2012. **In Press, Corrected Proof**.
2. Blume-Jensen, P. and T. Hunter, *Oncogenic kinase signalling*. Nature, 2001. **411**(6835): p. 355-365.
3. Brockhoff, G., et al., *Epidermal growth factor receptor, c-erbB2 and c-erbB3 receptor interaction, and related cell cycle kinetics of SK-BR-3 and BT474 breast carcinoma cells*. Cytometry, 2001. **44**(4): p. 338-348.
4. Eccles, S.A., *The epidermal growth factor receptor/Erb-B/HER family in normal and malignant breast biology*. Int J Dev Biol, 2011. **55**(7-9): p. 685-696.
5. Sergina, N.V., et al., *Escape from HER-family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase-inactive HER3*. Nature, 2007. **445**(7126): p. 437-441.
6. Holbro, T., G. Civenni, and N.E. Hynes, *The ErbB receptors and their role in cancer progression*. Exp Cell Res, 2003. **284**(1): p. 99-110.
7. Al-Hasani, R. and M.R. Bruchas, *Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior*. Anesthesiology, 2011. **115**(6): p. 1363-1381.
8. Reisine, T. and G.I. Bell, *Molecular biology of opioid receptors*. Trends in Neurosciences, 1993. **16**(12): p. 506-510.
9. Corbett, A.D., et al., *75 years of opioid research: the exciting but vain quest for the Holy Grail*. Br J Pharmacol, 2006. **147 Suppl 1**: p. S153-S162.
10. Afsharimani, B., P.J. Cabot, and M.O. Parat, *Morphine and tumor growth and metastasis*. Cancer Metastasis Rev, 2011. **30**(2): p. 225-238.
11. Tegeder, I. and G. Geisslinger, *Opioids As Modulators of Cell Death and Survival - Unraveling Mechanisms and Revealing New Indications*. Pharmacological Reviews, 2004. **56**(3): p. 351-369.

12. Ahlbeck, K., *Opioids: a two-faced Janus*. Curr Med Res Opin, 2011. **27**(2): p. 439-448.
13. Minami, M. and M. Satoh, *Molecular biology of the opioid receptors: structures, functions and distributions*. Neuroscience Research, 1995. **23**(2): p. 121-145.
14. Pert, C.B. and S.H. Snyder, *Opiate Receptor: Demonstration in Nervous Tissue*. Science, 1973. **179**(4077): p. 1011-1014.
15. Simon, E.J., J.M. Hiller, and I. Edelman, *Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic (3H) Etorphine to rat-brain homogenate*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1973. **70**(7): p. 1947-1949.
16. Cox, B.M. and M. Weinstock, *Quantitative studies of the antagonism by Nalorphine of some of the actions of Morphine-like analgesic drugs*. Br J Pharmacol Chemother, 1964. **22**: p. 289-300.
17. Veatch, R.M., T.K. Adler, and E.L. Way, *The importance of steric configuration in certain Morphine-mimetic actions of synthetic analgesics* J Pharmacol Exp Ther, 1964. **145**: p. 11-19.
18. Gilbert, P.E. and W.R. Martin, *The effects of morphine and nalorphine-like drugs in the nondependent, morphine-dependent and cyclazocine-dependent chronic spinal dog*. J Pharmacol Exp Ther, 1976. **198**(1): p. 66-82.
19. Martin, W.R., et al., *The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog*. J Pharmacol Exp Ther, 1976. **197**(3): p. 517-532.
20. Lord, J.A., et al., *Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors*. Nature, 1977. **267**(5611): p. 495-499.
21. Schulz, R., et al., *Selective receptors for beta-endorphin on the rat vas deferens*. Life Sci, 1979. **24**(9): p. 843-849.
22. Chiesa, R., W.I. Silva, and F.L. Renaud, *Pharmacological characterization of an opioid receptor in the ciliate Tetrahymena*. J Eukaryot Microbiol, 1993. **40**(6): p. 800-804.
23. Harrison, L.M., A.J. Kastin, and J.E. Zadina, *Opiate tolerance and dependence: receptors, G-proteins, and antiopiates*. Peptides, 1998. **19**(9): p. 1603-1630.

24. Smith, A.P. and N.M. Lee, *Opioid receptor interactions: local and nonlocal, symmetric and asymmetric, physical and functional*. Life Sci, 2003. **73**(15): p. 1873-1893.
25. Evans, C.J., et al., *Cloning of a delta opioid receptor by functional expression*. Science, 1992. **258**(5090): p. 1952-1955.
26. Chen, Y., et al., *Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain*. Mol Pharmacol, 1993. **44**(1): p. 8-12.
27. Meng, F., et al., *Cloning and pharmacological characterization of a rat kappa opioid receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(21): p. 9954-9958.
28. Kieffer, B.L., et al., *The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(24): p. 12048-12052.
29. Law, P.Y., Y.H. Wong, and H.H. Loh, *Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2000. **40**: p. 389-430.
30. Khotib, J., et al., *Functional interaction among opioid receptor types: up-regulation of μ - and δ -opioid receptor functions after repeated stimulation of κ -opioid receptors*. Neuropharmacology, 2004. **46**(4): p. 531-540.
31. Eisinger, D.A., H. Ammer, and R. Schulz, *Chronic morphine treatment inhibits opioid receptor desensitization and internalization*. J Neurosci, 2002. **22**(23): p. 10192-10200.
32. Waldhoer, M., S.E. Bartlett, and J.L. Whistler, *Opioid receptors*. Annu Rev Biochem, 2004. **73**: p. 953-990.
33. Ji, T.H., M. Grossmann, and I. Ji, *G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions*. J Biol Chem, 1998. **273**(28): p. 17299-17302.
34. Bockaert, J., *G proteins and G-protein-coupled receptors: structure, function and interactions*. Current Opinion in Neurobiology, 1991. **1**(1): p. 32-42.
35. Standifer, K.M. and G.W. Pasternak, *G Proteins and Opioid Receptor-Mediated Signalling*. Cellular Signalling, 1997. **9**(3-4): p. 237-248.
36. Neer, E.J., *G proteins: critical control points for transmembrane signals*. Protein Sci, 1994. **3**(1): p. 3-14.

37. Gudermann, T., F. Kalkbrenner, and G. Schultz, *Diversity and selectivity of receptor-G protein interaction*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1996. **36**: p. 429-459.
38. Connor, M. and M.D. Christie, *Opioid receptor signalling mechanisms*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 1999. **26**(7): p. 493-499.
39. Gilman, A.G., *G proteins: transducers of receptor-generated signals*. Annu Rev Biochem, 1987. **56**: p. 615-649.
40. Hurley, J.H., *The adenylyl and guanylyl cyclase superfamily*. Current Opinion in Structural Biology, 1998. **8**(6): p. 770-777.
41. Hanoune, J., et al., *Adenylyl cyclases: structure, regulation and function in an enzyme superfamily*. Mol Cell Endocrinol, 1997. **128**(1-2): p. 179-194.
42. Cooper, D.M., *Regulation and organization of adenylyl cyclases and cAMP*. Biochem J, 2003. **375**(Pt 3): p. 517-529.
43. Ammer, H. and T.E. Christ, *Identity of adenylyl cyclase isoform determines the G protein mediating chronic opioid-induced adenylyl cyclase supersensitivity*. J Neurochem, 2002. **83**(4): p. 818-827.
44. Zadina, J.E., et al., *A potent and selective endogenous agonist for the [micro]-opiate receptor*. Nature, 1997. **386**(6624): p. 499-502.
45. Toll, L., et al., *Standard binding and functional assays related to medications development division testing for potential cocaine and opiate narcotic treatment medications*. NIDA Res Monogr, 1998. **178**: p. 440-466.
46. Keith, D.E., et al., *Morphine activates opioid receptors without causing their rapid internalization*. J Biol Chem, 1996. **271**(32): p. 19021-19024.
47. Luttrell, L.M. and R.J. Lefkowitz, *The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 3): p. 455-465.
48. Chen, Y.L., P.Y. Law, and H.H. Loh, *The other side of the opioid story: modulation of cell growth and survival signaling*. Curr Med Chem, 2008. **15**(8): p. 772-778.
49. Warren, C.M. and R. Landgraf, *Signaling through ERBB receptors: multiple layers of diversity and control*. Cell Signal, 2006. **18**(7): p. 923-933.

50. Yarden, Y. and M.X. Sliwkowski, *Untangling the ErbB signalling network*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(2): p. 127-137.
51. Marmor, M.D., K.B. Skaria, and Y. Yarden, *Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004. **58**(3): p. 903-913.
52. Sweeney, C. and K.L. Carraway, 3rd, *Ligand discrimination by ErbB receptors: differential signaling through differential phosphorylation site usage*. Oncogene, 2000. **19**(49): p. 5568-5573.
53. Kataoka, H., *EGFR ligands and their signaling scissors, ADAMs, as new molecular targets for anticancer treatments*. Journal of Dermatological Science, 2009. **56**(3): p. 148-153.
54. Schlessinger, J. and A. Ullrich, *Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases*. Neuron, 1992. **9**(3): p. 383-391.
55. Colombo, M., et al., *HER2 targeting as a two-sided strategy for breast cancer diagnosis and treatment: Outlook and recent implications in nanomedical approaches*. Pharmacological Research, 2010. **62**(2): p. 150-165.
56. Manning, B.D. and L.C. Cantley, *AKT/PKB signaling: navigating downstream*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1261-1274.
57. Hayashi, H., et al., *Down-regulation of the PI3-kinase/Akt pathway by ERK MAP kinase in growth factor signaling*. Genes Cells, 2008. **13**(9): p. 941-947.
58. Eisinger, D.A. and H. Ammer, *Delta-opioid receptors activate ERK/MAP kinase via integrin-stimulated receptor tyrosine kinases*. Cell Signal, 2008. **20**(12): p. 2324-2331.
59. Kramer, H.K. and E.J. Simon, *μ and δ -opioid receptor agonists induce mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation in the absence of receptor internalization*. Neuropharmacology, 2000. **39**(10): p. 1707-1719.
60. Korzh, A., et al., *Modulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) by opioid and cannabinoid receptors that are expressed in the same cell*. Brain Research, 2008. **1189**(0): p. 23-32.
61. Waskiewicz, A.J. and J.A. Cooper, *Mitogen and stress response pathways: MAP kinase cascades and phosphatase regulation in mammals and yeast*. Curr Opin Cell Biol, 1995. **7**(6): p. 798-805.

62. Plotnikov, A., et al., *The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2011. **1813**(9): p. 1619-1633.
63. Chen, R.E. and J. Thorner, *Function and regulation in MAPK signaling pathways: Lessons learned from the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2007. **1773**(8): p. 1311-1340.
64. Davis, R.J., *The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway*. J Biol Chem, 1993. **268**(20): p. 14553-14556.
65. Fang, J.Y. and B.C. Richardson, *The MAPK signalling pathways and colorectal cancer*. The Lancet Oncology, 2005. **6**(5): p. 322-327.
66. Muller, D.L. and E.M. Unterwald, *In vivo regulation of extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) and protein kinase B (Akt) phosphorylation by acute and chronic morphine*. J Pharmacol Exp Ther, 2004. **310**(2): p. 774-782.
67. Schulz, R., D.A. Eisinger, and A. Wehmeyer, *Opioid control of MAP kinase cascade*. European Journal of Pharmacology, 2004. **500**(1-3): p. 487-497.
68. Bellacosa, A., et al., *Activation of AKT Kinases in Cancer: Implications for Therapeutic Targeting*, in *Advances in Cancer Research*, F.V.W. George and K. George, Editors. 2005, Academic Press. p. 29-86.
69. Martinez-Marti, A. and E. Felip, *PI3K Pathway in NSCLC*. Front Oncol, 2011. **1**: p. 55.
70. Engelman, J.A., J. Luo, and L.C. Cantley, *The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism*. Nat Rev Genet, 2006. **7**(8): p. 606-619.
71. Lasfargues, E.Y., W.G. Coutinho, and A.S. Dion, *A human breast tumor cell line (BT-474) that supports mouse mammary tumor virus*. In Vitro, 1979. **15**(9): p. 723-729.
72. Lasfargues, E.Y., W.G. Coutinho, and E.S. Redfield, *Isolation of two human tumor epithelial cell lines from solid breast carcinomas*. J Natl Cancer Inst, 1978. **61**(4): p. 967-978.
73. Nahta, R., et al., *Mechanisms of disease: understanding resistance to HER2-targeted therapy in human breast cancer*. Nat Clin Pract Oncol, 2006. **3**(5): p. 269-280.

74. Hermanto, U., C.S. Zong, and L.-H. Wang, *ErbB2-overexpressing human mammary carcinoma cells display an increased requirement for the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway in anchorage-independent growth*. *Oncogene*, 2001. **20**(51): p. 7551-7562.
75. Chen, X., T.K. Yeung, and Z. Wang, *Enhanced Drug Resistance in Cells Coexpressing ErbB2 with EGF Receptor or ErbB3*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000. **277**(3): p. 757-763.
76. Nielsen, D.L., M. Andersson, and C. Kamby, *HER2-targeted therapy in breast cancer. Monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors*. *Cancer Treatment Reviews*, 2009. **35**(2): p. 121-136.
77. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. *J Biol Chem*, 1951. **193**(1): p. 265-275.
78. DeBlasi, A., K. O' Reilly, and H.J. Motulsky, *Calculating receptor number from binding experiments using same compound as radioligand and competitor*. *Trends Pharmacol Sci*, 1989. **10**(6): p. 227-229.
79. Koyyalagunta, D., et al., *A systematic review of randomized trials on the effectiveness of opioids for cancer pain*. *Pain Physician*, 2012. **15**(3 Suppl): p. ES39-58.
80. Majumdar, S., et al., *Truncated G protein-coupled mu opioid receptor MOR-1 splice variants are targets for highly potent opioid analgesics lacking side effects*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(49): p. 19778-19783.
81. Quigley, C., *The role of opioids in cancer pain*. *BMJ*, 2005. **331**(7520): p. 825-829.
82. Beresford, M., G. Wilson, and A. Makris, *Measuring proliferation in breast cancer: practicalities and applications*. *Breast Cancer Research*, 2006. **8**(6): p. 216.
83. Swanton, C., *Cell-cycle targeted therapies*. *The Lancet Oncology*, 2004. **5**(1): p. 27-36.
84. Polosa, R., et al., *Expression of c-erbB receptors and ligands in human bronchial mucosa*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1999. **20**(5): p. 914-923.
85. Prigent, S.A. and N.R. Lemoine, *The type 1 (EGFR-related) family of growth factor receptors and their ligands*. *Progress in Growth Factor Research*, 1992. **4**(1): p. 1-24.

86. Hudelist, G., et al., *Co-expression of ErbB-family members in human breast cancer: Her-2/neu is the preferred dimerization candidate in nodal-positive tumors*. Breast Cancer Res Treat, 2003. **80**(3): p. 353-361.
87. Gach, K., et al., *The role of morphine in regulation of cancer cell growth*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2011. **384**(3): p. 221-230.
88. Ishikawa, M., et al., *Enhancement of tumor growth by morphine and its possible mechanism in mice*. Biol Pharm Bull, 1993. **16**(8): p. 762-766.
89. Gupta, K., et al., *Morphine stimulates angiogenesis by activating proangiogenic and survival-promoting signaling and promotes breast tumor growth*. Cancer Res, 2002. **62**(15): p. 4491-4498.
90. Simon, R.H. and T.E. Arbo, *Morphine increases metastatic tumor growth*. Brain Research Bulletin, 1986. **16**(3): p. 363-367.
91. Moon, T.D., *The effect of opiates upon prostatic carcinoma cell growth*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1988. **153**(2): p. 722-727.
92. Miyatake, M., et al., *Inhibition of EGF-induced ERK/MAP kinase-mediated astrocyte proliferation by mu opioids: integration of G protein and beta-arrestin 2-dependent pathways*. J Neurochem, 2009. **110**(2): p. 662-674.
93. Hatzoglou, A., E. Bakogeorgou, and E. Castanas, *The antiproliferative effect of opioid receptor agonists on the T47D human breast cancer cell line, is partially mediated through opioid receptors*. Eur J Pharmacol, 1996. **296**(2): p. 199-207.
94. Sueoka, E., et al., *Anticancer Activity of Morphine and Its Synthetic Derivative, KT-90, Mediated through Apoptosis and Inhibition of NF- κ B Activation*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1998. **252**(3): p. 566-570.
95. Yeager, M.P. and T.A. Colacchio, *Effect of morphine on growth of metastatic colon cancer in vivo*. Arch Surg, 1991. **126**(4): p. 454-456.
96. Page, G.G., et al., *Morphine attenuates surgery-induced enhancement of metastatic colonization in rats*. Pain, 1993. **54**(1): p. 21-28.
97. Schwindinger, W.F. and J.D. Robishaw, *Heterotrimeric G-protein betagamma-dimers in growth and differentiation*. Oncogene, 2001. **20**(13): p. 1653-1660.

98. Tegeder, I., et al., *G protein-independent G1 cell cycle block and apoptosis with morphine in adenocarcinoma cells: involvement of p53 phosphorylation*. Cancer Res, 2003. **63**(8): p. 1846-1852.
99. Heiss, A., H. Ammer, and D.A. Eisinger, *delta-Opioid receptor-stimulated Akt signaling in neuroblastoma x glioma (NG108-15) hybrid cells involves receptor tyrosine kinase-mediated PI3K activation*. Exp Cell Res, 2009. **315**(12): p. 2115-2125.
100. Serra, V., et al., *PI3K inhibition results in enhanced HER signaling and acquired ERK dependency in HER2-overexpressing breast cancer*. Oncogene, 2011. **30**(22): p. 2547-2557.
101. Hacker, G., *The morphology of apoptosis*. Cell Tissue Res, 2000. **301**(1): p. 5-17.
102. Bani, D., et al., *Differentiation of breast cancer cells in vitro is promoted by the concurrent influence of myoepithelial cells and relaxin*. Br J Cancer, 1994. **70**(5): p. 900-904.
103. Hijazi, M.M., et al., *Heregulin regulates the actin cytoskeleton and promotes invasive properties in breast cancer cell lines*. Int J Oncol, 2000. **17**(4): p. 629-641.
104. Breuleux, M., *Role of heregulin in human cancer*. Cell Mol Life Sci, 2007. **64**(18): p. 2358-2377.
105. Prenzel, N., et al., *The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification*. Endocr Relat Cancer, 2001. **8**(1): p. 11-31.
106. Hynes, N.E., et al., *The ErbB receptor tyrosine family as signal integrators*. Endocr Relat Cancer, 2001. **8**(3): p. 151-159.
107. Skolnik, E.Y., et al., *The SH2/SH3 domain-containing protein GRB2 interacts with tyrosine-phosphorylated IRS1 and Shc: implications for insulin control of ras signalling*. Embo J, 1993. **12**(5): p. 1929-1936.
108. Castellano, E. and J. Downward, *RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway*. Genes Cancer, 2011. **2**(3): p. 261-274.
109. Gijssen, M., et al., *HER2 phosphorylation is maintained by a PKB negative feedback loop in response to anti-HER2 herceptin in breast cancer*. PLoS Biol, 2010. **8**(12): p. e1000563.

110. Wennstrom, S. and J. Downward, *Role of phosphoinositide 3-kinase in activation of ras and mitogen-activated protein kinase by epidermal growth factor*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(6): p. 4279-4288.
111. Shankaran, H., H.S. Wiley, and H. Resat, *Modeling the effects of HER/ErbB1-3 coexpression on receptor dimerization and biological response*. Biophys J, 2006. **90**(11): p. 3993-4009.
112. Lemmon, M.A. and J. Schlessinger, *Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases*. Cell, 2010. **141**(7): p. 1117-1134.
113. Eisinger, D.A. and H. Ammer, *Down-regulation of c-Cbl by morphine accounts for persistent ERK1/2 signaling in delta-opioid receptor-expressing HEK293 cells*. J Biol Chem, 2009. **284**(50): p. 34819-34828.
114. Lerdrup, M., et al., *Endocytic down-regulation of ErbB2 is stimulated by cleavage of its C-terminus*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(9): p. 3656-3666.
115. Kong, A., et al., *HER2 oncogenic function escapes EGFR tyrosine kinase inhibitors via activation of alternative HER receptors in breast cancer cells*. PLoS One, 2008. **3**(8): p. e2881.
116. Garrett, J.T., et al., *Transcriptional and posttranslational up-regulation of HER3 (ErbB3) compensates for inhibition of the HER2 tyrosine kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(12): p. 5021-5026.
117. Lee-Hoeflich, S.T., et al., *A central role for HER3 in HER2-amplified breast cancer: implications for targeted therapy*. Cancer Res, 2008. **68**(14): p. 5878-5887.
118. Whistler, J.L. and M. von Zastrow, *Morphine-activated opioid receptors elude desensitization by beta-arrestin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(17): p. 9914-9919.

X ANHANG

1. Abbildungsverzeichnis

Abb.1	Schematische Struktur eines G-Protein-gekoppelten Opioid-Rezeptors	S.6
Abb.2	ErbB Rezeptoren und ihre endogenen Liganden	S.12
Abb.3	Aktivierung der ErbB Rezeptoren	S.13
Abb.4	Nachweis endogener Opioid-Rezeptoren in BT474 Zellen	S.50
Abb.5	G-Protein-Ausstattung der BT474 Zellen	S.51
Abb.6	Nachweis verschiedener Adenylylcyclase-Isoformen in BT474 Zellen	S.52
Abb.7	Regulation der cAMP-Akkumulation in BT474 Zellen durch μ -Opioid-Rezeptoren	S.53
Abb.8	Hemmung des Zellwachstums durch Morphin	S.54
Abb.9	Regulation des Zellwachstums der BT474 Zellen nach 5-tägiger Behandlung mit Opioiden und/oder Heregulin- β 1	S.54
Abb.10	Aktivierung der Erk1/2 durch Opioide	S.56
Abb.11	Einfluss einer Morphin-Behandlung auf die Proliferationsrate der BT474 Zellen	S.57
Abb.12	Phosphorylierung der Akt nach Morphin-Behandlung	S.58
Abb.13	Auftreten von PARP-Abbauprodukten nach Opioid-Behandlung	S.60
Abb.14	Induktion der Apoptose in BT474 Zellen durch Morphin	S.61
Abb.15	Auswirkungen der Inkubation mit Proteininhibitoren auf die durch μ -Opioid-Rezeptoren vermittelte Erk1/2-Phosphorylierung	S.63

Abb.16	Veränderungen in der Opioid-vermittelten Akt- Phosphorylierung nach Vorinkubation mit verschiedenen Proteininhibitoren	S.64
Abb.17	Erk1/2- und Akt-Aktivierung nach Stimulation mit dem ErbB1 Liganden EGF	S.66
Abb.18	Veränderung in der ErbB Rezeptor-Menge nach chronischer Morphin-Behandlung	S.67
Abb.19	Modulation der Heterodimere mit ErbB1-Beteiligung nach chronischer Opioid-Behandlung	S.68
Abb.20	Schematische Darstellung der vorgeschlagenen, durch chronische Morphin-Behandlung ausgelösten Veränderungen in der ErbB-vermittelten Signaltransduktion nach Stimulation durch Heregulin- β 1	S.81

XI DANKSAGUNG

Mein Dank gilt in erster Linie meinem Doktorvater Hermann Ammer, der die Rahmenbedingungen für das Entstehen dieser Arbeit geschaffen hat. Seine stetige Diskussionsbereitschaft und konstruktive Kritik waren für das Gelingen dieser Arbeit unverzichtbar. Herzlich bedanken möchte ich mich auch für seine herausragende wissenschaftliche Betreuung, die exzellente Einführung in das weite Themengebiet der opioidergen Wirkmechanismen und für seine Unterstützung mit Rat und Tat bei dem ein oder anderen technischen Problem. Die unvergleichliche und motivierende Arbeitsatmosphäre war nicht zuletzt seiner Person zu verdanken.

Darüber hinaus gilt mein besonderer Dank Sarah Koutnik und Corinna Mangels für die schöne Zeit und die moralische Unterstützung. Bei Sarah Koutnik möchte ich mich zudem noch für die ausgezeichnete Einführung in die verwendeten Methoden und die Unterstützung bei der Versuchsdurchführung bedanken. Andreas Blaschke danke ich für die Hilfe bei der Anfertigung der konfokalen Aufnahmen.

Allen Mitarbeitern des Institutes für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät der LMU gilt mein Dank für eine schöne Zeit, eine tolle Atmosphäre und viele konstruktive Gespräche.

Zuletzt möchte ich die Gelegenheit nutzen und mich bei meiner Familie bedanken. Bei meinen lieben Eltern und meinen unglaublichen Brüdern für ihr unermüdliches Interesse an meiner Arbeit und die vielen wertvollen Ratschläge. Bei meinem Freund Christoph möchte ich mich von ganzem Herzen für den uneingeschränkten Rückhalt bedanken. Zu guter Letzt möchte ich mich noch bei meiner Oma bedanken, die vor allem durch die Versorgung mit exquisiter fränkischer Küche stets meine geistige Leistungsfähigkeit fördert.